

**Conservação do soro e leite de pequenos ruminantes:
Ativação do sistema lactoperoxidase/tiocianato**

Margarida Seabra Filipe

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar

Orientador: Professor Doutor António Pedro Louro Martins

Júri:

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Associada com
Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutora Maria Isabel Nunes Januário, Professora Auxiliar do Instituto Superior de
Agronomia da Universidade de Lisboa

Doutor António Pedro Louro Martins, Professor Auxiliar Convidado do Instituto
Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Agradecimentos

Concluída esta dissertação chega a hora de agradecer a todos os que se cruzaram na minha vida, contribuindo para a minha formação académica e pessoal, que de alguma forma me apoiaram e tornaram possível o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Doutor António Pedro Louro Martins, pelo contributo e apoio neste trabalho, não só no esclarecimento de dúvidas e passagem de conhecimento, mas também pela ajuda com o desenvolvimento da componente prática e por me ter "ensinado" que "não resultados também são resultados".

À Dr.^a Maria João Trigo e à Eng.^a Paula Martins, pelo acompanhamento no laboratório de microbiologia, pela transmissão de conhecimentos e pela disponibilidade e atenção no esclarecimento das minhas dúvidas.

À Sandra Gomes, pela maneira como me recebeu, pela disponibilidade em ajudar no que fosse necessário, por tornar a integração no INIAV mais simples, e pela leitura e revisão da presente dissertação.

À Professora Doutora Luísa Louro, pela disponibilidade em me apoiar no desenvolvimento da revisão bibliográfica da presente dissertação.

À Dr.^a Manuela, à Dr.^a Cristina e às Técnicas de Laboratório de microbiologia, Ana Magalhães e Maria do Carmo, que sempre estiveram disponíveis para me ensinar práticas de laboratório e disponíveis para o esclarecimento de qualquer dúvida.

A todas as minhas colegas de laboratório Catarina, Ana, Joana e também a D^a. Fernanda, que nunca hesitaram em ajudar-me no laboratório, mas também pelos almoços e conversas animadas. Agradeço também à Andreia, minha colega no Instituto Superior de Agronomia e no estágio de dissertação por todo o apoio ao longo deste período.

À D.^a Paula, pela alegria e boa disposição matinal, que tornou o ambiente de laboratório mais divertido.

Ao Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV) agradeço a cedência das instalações e todo o equipamento para a realização deste trabalho.

À Cooperativa de Produtores de Leite de Cabra Serrana (LEICRAS), à Associação Nacional Criadores Ovinos Serra da Estrela (ANCOSE), à Associação Nacional de Caprinicultores da Raça Serrana (ANCRAS), à Queijos Santiago, à Herdade da Amendoeira, Mértola e ao pólo de Santarém do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, por terem cedido os leites de cabra, de ovelha e o soro de leite utilizados para a realização deste trabalho.

À minha família, em especial aos meus avós, por toda a amizade, carinho e pela contínua preocupação com a minha formação; aos meus pais por toda a dedicação na construção do meu futuro e por sempre quererem o meu bem, mesmo que às vezes eu não o entenda, e à minha irmã por toda a amizade, partilha e conselhos, a quem também agradeço a leitura atenta da dissertação.

Aos meus amigos, Carolina, Margarida, Pedro, Inês e Marta, que me acompanharam ao longo do Curso, por todos os bons momentos, por todas as recordações, pelos trabalhos de grupos, por toda a partilha e pela vontade em comum de nos superarmos. Agradeço também às minhas

amigas de infância, Filipa, Joana e Carolina, por todo o apoio dado no decorrer da realização da presente dissertação.

Por fim, mas não menos importante, a todos os Professores, desde os primeiros anos de escola, que de alguma forma me moldaram enquanto pessoa e pela transmissão dos seus conhecimentos, que de forma e em momentos diferentes da minha vida, permitiram a minha formação em Engenharia Alimentar.

Este trabalho foi realizado com o contributo do Projeto PDR 2020–101–031018: SerpaFlora – Valorização da Flora Autóctone do Queijo Serpa, cofinanciado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Rural (FEDER) e pelo Programa de Desenvolvimento Rural PDR 2020, ao qual se agradece.

Resumo

Neste trabalho, avaliou-se a ativação do sistema lactoperoxidase/tiocianato do leite como processo de conservação de leites de ovelha, de cabra e de soros de leites de mistura (vaca e cabra) e de cabra. A partir das indicações do guia *Codex Alimentarius – Guidelines for the preservation of raw milk by use the lactoperoxidase system*, realizaram-se ensaios de conservação a 15°C, utilizando a quantidade padrão indicada e o dobro das quantidades de reagentes para ativação, tendo como controlo a conservação a 6°C, processo mais usado na conservação do leite. Foi ainda efetuado um ensaio de conservação a 30°C, com ativação do sistema em estudo.

Após a caracterização dos produtos em estudo procedeu-se à comparação de procedimentos de conservação. Para caracterizar os produtos em estudo, determinaram-se a constituição físico-química dos produtos, o pH e a concentração de tiocianato presente nos mesmos. Para determinar a resposta das amostras à ativação do sistema analisou-se a evolução de diversos parâmetros microbiológicos e químicos.

Os valores determinados da composição físico-química e do pH estão dentro dos estabelecidos para os produtos. Os resultados obtidos de concentração de tiocianato são compatíveis com a aplicação do sistema, não se verificando a concordância com os valores bibliográficos.

Dos ensaios concluiu-se que a ativação do sistema não se revelou eficiente na conservação dos leites a 15°C face à eficiência da refrigeração, assinalando-se um possível efeito da carga microbiana inicial dos produtos. Quanto ao soro de leite os resultados não são conclusivos, uma vez que se obtiveram respostas distintas ao sistema, o que se pode dever a características diferentes dos soros de leites. No entanto, a 30°C foi possível detetar algum efeito do sistema de ativação compatível com o esperado.

Não se assumem os resultados como conclusivos, pois de um modo geral, não se apresentaram conforme o esperado, mas apontam-se algumas pistas para a continuação do estudo do tema.

Palavras-chaves: Sistema lactoperoxidase/tiocianato, Conservação de leite, Leite de ovelha, Leite de cabra, Soro de leite

Abstract

In this work, the activation of the milk lactoperoxidase-thiocyanate system was evaluated as a process for the conservation of sheep, goat milk and mixed (cow and goat) and goat whey. From the guidelines of the Codex Alimentarius Guidelines for the Preservation of Raw Milk by Using the Lactoperoxidase System, the conservation trials were conducted at 15°C using the indicated standard amount and the double of the amounts of activating reagents, having as a control the conservation at 6°C, the process mostly used in milk conservation. A conservation test was also carried out at 30°C, with the activation of the system in determination.

After optimization of the lactoperoxidase-thiocyanate system, the conservation procedures were compared. The physical and chemical constitution, pH and thiocyanate concentration of the products used in the trial were determined to better characterize them. Microbiological and chemical parameters were analysed to determine the samples' response to the system's activation.

The physico-chemical composition and the pH values are within those established for these products. The results obtained from the thiocyanate concentration are compatible with the application of the system, but not in conformity with bibliographic values.

From the essays it was concluded that the activation of the system was not efficient in the milks' conservation at 15°C facing the efficiency of the refrigeration, possibly with effect from the initial microbial load. As for the whey, the results are inconclusive, since different responses were obtained to the system, which may be due to the whey's different characteristics. However, the trial at 30°C showed some effects from the activation of the system, as initially expected.

The results are not considered to be conclusive, since in a general way, they did not present themselves as expected, but there are some indicators that point out the importance of the continuity of this study.

Palavras-chave: Lactoperoxidase-thiocyanate system, Milk conservation, Sheep milk, Goat milk, whey

Índice

Resumo	I
Abstract.....	II
Índice	III
Índice de figuras	V
Índice de tabelas	VIII
Lista de abreviaturas	IX
1 Fundamento do trabalho	1
2 Revisão bibliográfica	3
2.1 Leite e soro de leite alimentar.....	3
2.1.1 Principais componentes do leite.....	5
2.1.1.1 Gordura.....	5
2.1.1.2 Proteína	6
2.1.1.3 Lactose	7
2.2 Atividade microbiana.....	8
2.3 O Sistema Lactoperoxidase/Tiocianato.....	9
2.3.1 Enzima Lactoperoxidase	9
2.3.1.1 Propriedades físico-químicas	11
2.3.1.2 Estabilidade	11
2.3.1.2.1 Temperatura	11
2.3.1.2.2 pH	13
2.3.1.2.3 Outros condicionantes.....	13
2.3.2 Ião tiocianato	14
2.3.3 Peróxido de hidrogénio.....	16
2.3.4 Mecanismo de reação do sistema lactoperoxidase/tiocianato	17
2.3.4.1 Mecanismo enzimático	17
2.3.4.2 Peroxidação do ião tiocianato	20
2.3.4.3 Oxidação dos grupos sulfidrilos.....	23
2.3.4.4 Reação das células ao sistema lactoperoxidase/tiocianato	24
2.4 Efeito da aplicação do sistema lactoperoxidase/tiocianato.....	26
2.4.1 Efeitos tóxicos sobre os consumidores dos produtos lácteos.....	26
2.4.2 Efeitos nos componentes nutricionais, tecnológicos e sensoriais dos produtos lácteos	27
2.5 Outros processos de controlo microbiológico.....	29
2.5.1 Microfiltração	29
2.5.2 Centrifugação de alta velocidade	29
2.5.3 Processamento de alta pressão hidrostática	29
2.5.4 Refrigeração e ativação do sistema lactoperoxidase/tiocianato	30
3 Objetivos e delineamento experimental	31
4 Materiais e métodos	32

4.1	Leite e soro de leite.....	32
4.2	Determinações analíticas.....	32
4.2.1	Caracterização dos produtos em estudo.....	32
4.2.1.1	Composição físico-química e pH.....	32
4.2.1.2	Concentração de tiocianato.....	32
4.3	Comparação de procedimentos de conservação.....	34
4.3.1.1	Componente Microbiana	35
4.3.1.2	pH e acidez titulável	35
4.3.1.3	Determinação do teor de peróxido de hidrogénio	35
4.4	Tratamento Estatístico.....	35
5	Resultados e discussão.....	36
5.1	Caracterização dos produtos em estudo.....	36
5.1.1	Composição físico-química	36
5.1.2	Concentração de tiocianato.....	37
5.1.2.1	Determinação da concentração de tiocianato	37
5.2	Avaliação da ativação do sistema lactoperoxidase/tiocianato na conservação do leite e do soro de leite.....	38
5.2.1	Componente microbiana, pH e acidez titulável	38
5.2.1.1	Leite de ovelha	39
5.2.1.2	Leite de cabra	43
5.2.1.3	Soro de leite.....	47
5.2.1.3.1	Ensaio 1	49
5.2.1.3.2	Ensaio 2.....	52
5.2.1.3.3	Análise global dos ensaios de conservação do soro de leite.....	54
5.2.2	Medição do teor de peróxido de hidrogénio	54
5.2.3	Ensaio suplementares, com monitorização da acidez em 24/26 horas	55
5.2.3.1	Leite de cabra	55
5.2.3.2	Soro de leite de cabra	57
5.2.4	Avaliação global dos resultados	58
6	Conclusões.....	60
7	Bibliografia	62

Índice de figuras

Figura 1 - Compostos principais do leite. (adaptado de: Chandan, 1997).....	3
Figura 2 - Variações nas concentrações de lactose , gordura e proteína em leite de bovino durante a lactação. (fonte: Fox e McSweeney, 1998).....	4
Figura 3 - Modelo de submicela da micela de caseína. (fonte: Bylund, 2003).	6
Figura 4 – Esquematização da ligação β 1-4 entre galactose e glucose - Lactose. (fonte: http://bioquimicadanut.blogspot.com/2013/07/intolerancia-lactose.html - 19/07/2018)	7
Figura 5 - Inativação da enzima lactoperoxidase a diferentes temperaturas (a) bovino; (b) caprino (c) ovino.	12
Figura 6 - Tiocianato contido no soro de leite em cada mês de lactação. (fonte: Schoos <i>et al.</i> , 1999).	15
Figura 7 - Relação entre a concentração de tiocianato no soro de leite e a atividade da enzima lactoperoxidase.	15
Figura 8 - Mecanismos de reação da catálise pela lactoperoxidase. (adaptado de: Kussendrager e Van Hooijdonk, 2000).	17
Figura 9 - Taxa de reação entre o composto I da enzima lactoperoxidase com halogênios e pseudo-halogênios.	18
Figura 10 - Relação da concentração dos reagentes/produtos. Indicação do pH limiar.	19
Figura 11 - Taxa de formação (A), decaimento e duração (C) de composto II em função de SCN^-	20
Figura 12 - Relação entre o ião hipotiocianato e a atividade da enzima lactoperoxidase presentes no soro de cabras da raça Crioulo. (fonte: Schoos <i>et al.</i> , 1999).....	21
Figura 13 - Relação entre o ião tiocianato e a atividade da enzima lactoperoxidase presentes no soro de leite de cabras da raça Crioulo.....	21
Figura 14 - Relação entre formação de OSCN^- e diminuição da concentração de SCN^- na oxidação do mesmo, catalisada pela enzima lactoperoxidase. (fonte: Björck e Claesson, 1980).	22
Figura 15 - Curva de calibração para a determinação da concentração de tiocianato e respetiva equação ($y = 0,0182x - 0,0041$; $R^2 = 0,9999$, onde y representa a absorvância e x a concentração de tiocianato ($\mu\text{g/mL}$)).....	33
Figura 16 - Curva de calibração para a determinação da concentração de tiocianato e respetiva equação ($y = 0,0193x - 0,0058$; $R^2 = 1$, onde y representa a absorvância e x a concentração de tiocianato ($\mu\text{g/mL}$)).....	33
Figura 17 - Esquematização da metodologia de comparação de procedimentos de conservação pela análise da	34
Figura 18 - Esquematização da metodologia de comparação de procedimentos de conservação pela análise da evolução do pH e da acidez titulável.	35
Figura 19 - Caracterização físico-química dos produtos leite de ovelha, leite de cabra e soro de leite de cabra e de mistura (vaca e cabra), quanto aos teores em gordura, proteína, lactose, sólidos totais e sólidos não gordos.	36
Figura 20 - pH dos produtos leite de ovelha, leite de cabra e soro de leite de mistura (vaca e cabra) e de cabra.....	37

Figura 21 - Concentração de tiocianato nos produtos leites de ovelha, leites de cabra e soro de leites de mistura (vaca e cabra) e de cabra.....	38
Figura 22 - Evolução dos microrganismos <i>Enterobacteriaceae</i> do leite de ovelha, ao longo do tempo, para cada método de conservação.	40
Figura 23 - Evolução dos microrganismos mesófilos do leite de ovelha, ao longo do tempo, para cada método de conservação.	41
Figura 24 - Evolução dos microrganismos psicrotróficos do leite de ovelha, ao longo do tempo, para cada método de conservação	41
Figura 25 - Evolução do pH e da acidez titulável do leite de ovelha, ao longo do tempo, para cada método de conservação.	42
Figura 26 - Evolução dos microrganismos <i>Enterobacteriaceae</i> do leite de cabra, ao longo do tempo, nos diferentes métodos de conservação.....	44
Figura 27 - Evolução dos microrganismos mesófilos do leite de cabra, ao longo do tempo, nos diferentes métodos de conservação.	45
Figura 28 - Evolução dos microrganismos psicrotróficos do leite de cabra, ao longo do tempo, nos diferentes métodos de conservação.	45
Figura 29 - Evolução do pH e da acidez titulável do leite de cabra, ao longo do tempo, dos diferentes métodos de conservação.	46
Figura 30 - Evolução dos microrganismos <i>Enterobacteriaceae</i> do soro de leite ao longo do tempo, dos diferentes métodos de conservação.	47
Figura 31 - Evolução dos microrganismos mesófilos do soro de leite ao longo do tempo, dos diferentes métodos de conservação.	48
Figura 32 - Evolução dos microrganismos psicrotróficos do soro de leite ao longo do tempo, dos diferentes métodos de conservação.	48
Figura 33 - Evolução do pH e da acidez titulável do soro de leite, ao longo do tempo, dos diferentes métodos de conservação.	49
Figura 34 -Evolução dos microrganismos <i>Enterobacteriaceae</i> do soro de leite de mistura ao longo do tempo, para cada método de conservação (ensaio 1).	50
Figura 35 - Evolução dos microrganismos mesófilos do soro de leite de mistura ao longo do tempo, para cada método de conservação (ensaio 1).	50
Figura 36 - Evolução dos microrganismos psicrotróficos do soro de leite de mistura ao longo do tempo, para cada método de conservação	51
Figura 37 - Evolução do pH e da acidez do soro de leite de mistura ao longo do tempo, para cada método de conservação	51
Figura 38 - Evolução dos microrganismos <i>Enterobacteriaceae</i> do soro de leite de mistura ao longo do tempo, para cada método de conservação (ensaio 2).	52
Figura 39- Evolução dos microrganismos psicrotróficos do soro de leite de mistura ao longo do tempo, para cada método de conservação	53
Figura 40 - Evolução dos microrganismos mesófilos do soro de leite de mistura ao longo do tempo, para cada método de conservação	53

Figura 41 - Evolução do pH e da acidez do soro de leite de mistura ao longo do tempo, para cada método de conservação	54
Figura 42 - Evolução do pH e da acidez titulável do leite de cabra ao longo do tempo (0-6, 24 e 26 horas), para cada método de conservação.....	56
Figura 43 - Evolução do pH e da acidez titulável do leite de cabra ao longo do tempo (0-5 horas), para cada método de conservação.....	56
Figura 44 – Evolução do pH e da acidez titulável do leite de cabra, ao longo do tempo (0-7, 24 e 25 horas), para cada método de conservação.....	57
Figura 45 – Evolução do pH e da acidez titulável do soro de leite de cabra, ao longo do tempo (0-7, 24 horas), para cada método de conservação.....	58

Índice de tabelas

Tabela 1 - Relação tempo/temperatura aquando da ativação do sistema lactoperoxidase/tiocianato. (fonte: Codex Alimentarius, 1991).	1
Tabela 2 - Composição média de nutrientes básicos e pH do leite e soro de leite de vaca, ovelha e cabra. (adaptado de: Moulin e Galzy, 1984; Park <i>et al.</i> , 2007).	4
Tabela 3 - Concentração média da enzima lactoperoxidase em leites de diferentes espécies/racas.	10
Tabela 4 - Concentrações médias de ião tiocianato em leites de diferentes espécies/raças.	16
Tabela 5 - Teste de significância de cada variável dependente para o leite de ovelha.	39
Tabela 6 - Evolução dos parâmetros microbiológicos analisados (<i>Enterobacteriaceae</i> , mesófilos e psicrótrófilos) do leite de ovelha, ao longo do tempo, para cada método de conservação.	39
Tabela 7 - Evolução do pH do leite de ovelha, ao longo do tempo, para cada método de conservação.	42
Tabela 8 - Evolução da acidez titulável do leite de ovelha, ao longo do tempo, para cada método de conservação.	42
Tabela 9 - Teste de significância de cada variável dependente para o leite de cabra.	43
Tabela 10 - Evolução dos parâmetros microbiológicos analisados (<i>Enterobacteriaceae</i> , mesófilos e psicrótrófilos) do leite de cabra, ao longo do tempo, para cada método de conservação.	44
Tabela 11 - Evolução do pH do leite de cabra, ao longo do tempo, para cada método de conservação.	46
Tabela 12 - Evolução da acidez titulável do leite de cabra ao longo do tempo, para cada método de conservação.	46

Lista de abreviaturas

Br⁻ - Ião brometo

Cl⁻ - Ião cloreto

CN⁻ - Ião cianeto

DNA – Ácido desoxirribonucleico

FAD - Dinucleótido de flavina e adenina

FADH₂ – Forma reduzida de FAD (Dinucleótido de flavina e adenina)

H⁺ - Ião Hidrogênio

H₂O - Água

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HOSCN –Ácido hipotiocianoso

I⁻ - Ião iodeto

NADH – Forma reduzida de NAD⁺ (Dinucleótido de nicotinamida e adenina)

NADP⁺ - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

NADPH – Forma reduzida de NADP⁺ (Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina)

OH⁻ - Ião hidróxido

OSCN⁻ - Ião hipotiocianato

RNA – Ácido ribonucleico

R-SH – Grupo sulfidrilo

R-S-OH – Ácido sulfénico

R-S-SCN – Tiocianato de sulfenilo

SCN⁻ - Ião tiocianato

(SCN)₂ – Tiocianogênio

1 Fundamento do trabalho

A presente dissertação de mestrado está inserida na área de Laticínios e baseia-se na avaliação da aplicabilidade do sistema lactoperoxidase/tiocianato a leites de cabra, de ovelha e a soro de leite de cabra e de mistura (vaca e cabra), tendo por base os fundamentos existentes e testados para leites de vaca e de búfala.

O leite cru é caracterizado por veicular uma rica e diversificada microbiota, associada a um carácter facilmente perecível do produto. No sentido de diminuir a proliferação bacteriana no período que decorre entre a ordenha e o processamento, e dado que em algumas situações os encargos monetários/técnicos associados à refrigeração podem ser incomportáveis para os produtores, em 1967 o Expert Panel on Milk Quality da FAO/WHO tornou aceitável a utilização de peróxido de hidrogénio para conservação do leite, em condições extremas. Apesar das controvérsias levantadas pela possibilidade de camuflagem das condições não higiénicas de produção, bem como pelo desconhecimento das consequências toxicológicas do consumo de H_2O_2 em elevadas concentrações, o método químico de preservação do leite revelou-se vantajoso. Desse modo, em 1991, acontece a aprovação pelo Codex Alimentarius da ativação do sistema lactoperoxidase para leites de bovino e búfala (*Codex Alimentarius*, 1991).

O sistema lactoperoxidase/tiocianato é um mecanismo de defesa natural antimicrobiana, podendo ser encarado como um método de conservação do leite cru, com capacidade de preservação da qualidade microbiológica do leite por um tempo variável em função da temperatura, até um limite de 26 horas a 15 °C (*Codex Alimentarius*, 1991) (Tabela 1).

Tabela 1 - Relação tempo/temperatura aquando da ativação do sistema lactoperoxidase/tiocianato.

(fonte: *Codex Alimentarius*, 1991).

Temperatura (°C)	Tempo (horas)
30	7 - 8
25	11– 12
20	16 – 17
15	24 - 26

A aplicação deste processo para além de não eliminar a obrigatoriedade da passagem do leite por um processo de pasteurização antes do consumo humano, surge com algumas outras condições, devendo ser utilizado unicamente quando situações técnicas, económicas e/ou razões práticas não permitem a utilização de refrigeração. Não deve ser usado por produtores individuais, mas sim, por uma cooperativa de produtores, que devem estar equipados com instalações adequadas para limpeza e sanitização dos recipientes utilizados para armazenamento e transporte do leite. A FAO indica que a ativação do sistema deve ser da competência do responsável pela ordenha, o qual deve receber formação adequada, nomeadamente de higiene geral do leite. É da responsabilidade do responsável pelos processos industriais do leite controlar o método de ativação do sistema lactoperoxidase/tiocianato (*Codex Alimentarius*, 1991).

A aplicação do sistema referido centra-se nos produtores de pequenas dimensões, sem capacidades técnicas e/ou económicas de utilização de refrigeração e em especial nos países em desenvolvimento, onde o leite pela sua constituição poderia melhorar a nutrição dos seus habitantes, nos quais especialmente as gestantes, lactantes e crianças encontram-se subnutridas e as pessoas no geral vivem com alimentos de elevado teor de amido e baixo nível proteico (Chamberlain, 1989). Nesse sentido, a implementação do sistema lactoperoxidase/tiocianato nos países em desenvolvimento visa a salvaguarda da qualidade do leite, na perspetiva que este chegue nas condições devidas à comunidade. Nestas regiões o processo de recolha e entrega do leite é complicado e demorado, pois os produtores são muito dispersos, de produções muito reduzidas e os meios de refrigeração são escassos, podendo o tempo entre a ordenha e a entrega à indústria de processamento ultrapassar as cinco horas (<http://www.fao.org/docrep/v6200t/v6200T0t.htm#TopOfPage>). Tudo isto, em países onde as práticas são inadequadas e as condições ambientais favorecem o desenvolvimento microbiano do leite levando à perda de qualidade do mesmo, provocando no limite a deterioração e desperdício do produto. Ainda em favor da valorização deste sistema, deve considerar-se que nos países em desenvolvimento, existe em geral a adoção por parte destes das mesmas regulamentações que existem nos países desenvolvidos, nomeadamente a obrigatoriedade de utilização de refrigeração, resultando não só na dificuldade de desenvolvimento das indústrias, mas também no aumento de consumo de leite cru, bem como a existência de comércio informal responsável por mais de 80 % das trocas existentes (Tentoni *et al*, 1968; WHO/FAO, 2005).

A escolha dos leites de ovelha e de cabra para estudo da aplicação da ativação do sistema lactoperoxidase/tiocianato neste trabalho deve-se a serem as duas espécies produtoras com maior representatividade a seguir à vaca, as quais estão por norma associadas a produções de pequenas dimensões e a produtores pertencentes a estratos etários elevados, inseridos em sistema de produção economicamente débeis típicos de territórios de baixa densidade. Quanto ao soro de leite, este é um subproduto associado à indústria queijeira, no qual a mesma, por norma, e sobretudo se nos referirmos a uma de pequenas dimensões, não tem interesse em gastar muito capital na sua conservação e/ou transformação. O referido anteriormente associado à redução de produção de produtos lácteos verificada nos últimos anos (INE - Statistics Portugal, 2016) justifica a procura de outros métodos de conservação menos dispendiosos. O interesse por este sistema deve-se também ao crescente número de notícias nacionais de utilização em larga escala fraudulenta, de peróxido de hidrogénio, uma metodologia de conservação do leite também rejeitada pela FAO.

2 Revisão bibliográfica

2.1 Leite e soro de leite alimentar

Segundo a portaria nº 472/87 de 4 de Junho de 1987, entretanto já revogada enquanto diploma legal, leite alimentar é o leite cru destinado ao consumo humano de forma direta ou indireta proveniente da ordenha completa e interrupta, que não contem colostro, isento de coloração, cheiro e sabor anormais, que não contenha microrganismos patogénicos, pus, sangue nem substâncias estranhas à sua constituição ou composição química original. Relativamente aos animais de origem, estes devem ser saudáveis, bem alimentados, não fatigados e mantidos em bom estado de higiene, devendo o leite ser colhido dos mesmos, conservado e transportado tendo em conta as prescrições regulamentares em vigor. Relativamente à sua composição é um sistema coloidal formado por uma solução aquosa de lactose, sais, outros elementos dissolvidos, nomeadamente proteínas em suspensão e matéria gorda em emulsão e ainda componentes minoritários tais como enzimas, vitaminas e pigmentos (carotenos, xantofilas, riboflavina) (Amiot, 1991).

Por sua vez, o soro de leite é um efluente líquido, subproduto da produção de queijo, pela separação de caseínas e de gordura. Tal como no leite as suas características são variáveis, dependendo, para além dos fatores referidos anteriormente, do processo térmico utilizado para tratamento do leite, se existir, e da técnica de fabrico do queijo (Mavropoulou e Kosikowski, 1973; Zadow, 2012). Isto é, a precipitação das caseínas pode ser conseguida por duas vias distintas, pela acidificação do leite (produção de soro de leite ácido, pH não acima de 5,1) por fermentação através de adição de ácidos orgânicos ou minerais e pela destabilização da estrutura micelar por via enzimática, num meio de pH não inferior a 5,6 (produção de soro de leite doce). Estes processos resultam num pH ≤ 5 , no caso de um soro de leite ácido e um pH entre 6 e 7, quando nos referimos a um soro de leite doce, o qual contém uma concentração em ácido láctico muito reduzida mas que pode aumentar em grande escala se a fermentação bacteriana não for devidamente controlada por pasteurização e/ou arrefecimento rápido (Pearce, 1986; Morr, 1989; Carvalho *et al.*, 2013)

Na figura 1, estão representados de forma esquemática os compostos principais do leite, cuja composição química é dependente da espécie, do período entre lactações, do número de lactações, do período de lactação, de diferenças nos quartos do ubere, da alimentação, do estado de saúde, da atividade física e da idade do animal (Palmquist *et al.*, 1993; Chandan, 1997; Fox e McSweeney, 1998).

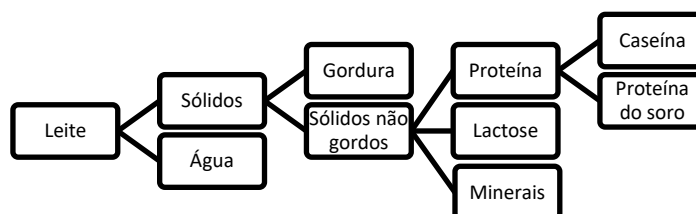


Figura 1 - Compostos principais do leite. (adaptado de: Chandan, 1997)

Tal como se verifica na figura 2, a concentração da gordura, da proteína e também dos sólidos totais é elevado no início da lactação, diminuindo rapidamente, atingindo um valor mínimo ao

2º/3º mês de lactação, a seguir ao qual aumenta até ao final da lactação. Relativamente à lactose, esta diminui progressivamente, de forma contínua ao longo da lactação. (Brozos *et al.*, 1998; Fox e McSweeney, 1998; Haenlein, 2001).

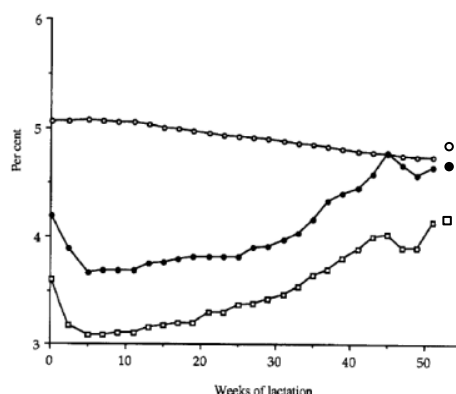


Figura 2 - Variações nas concentrações de lactose, gordura e proteína em leite de bovino durante a lactação. (fonte: Fox e McSweeney, 1998).

Tendo em conta o referido anteriormente, na tabela 2 é apresentada a composição média do leite de vaca, ovelha e cabra.

De um modo geral, a composição entre o leite das três espécies é semelhante, apresentando o leite de ovelha, em média, maior concentração de sólidos totais e de nutrientes, assim como no colostro. As diferenças existentes têm implicação no rendimento e textura dos produtos resultantes da transformação do leite. (Anifantakis, 1986; Grandison, 1986).

Tabela 2 - Composição média de nutrientes básicos e pH do leite e soro de leite de vaca, ovelha e cabra. (adaptado de: Moulin e Galzy, 1984; Park *et al.*, 2007).

Composição	Leite			Soro de leite			
	Vaca	Ovelha	Cabra	Vaca		Ovelha Doce	Cabra Ácido
				Doce	Ácido		
Sólidos totais (%)	12,7	19,3	12,3	7,1	6,6	8,4	6,3
Gordura (%)	3,6	7,9	3,8	0,5	0,1	0,6	0,04
Sólidos não gordos (%)	9,0	12,0	8,9	6,6	6,5	7,7	6,3
Lactose (%)	4,7	4,9	4,1	5,2	4,5	5,1	3,9
Proteína (%)	3,2	6,2	3,4	0,1	0,7	0,2	0,1
Azoto não proteico (%)	0,2	0,8	0,4	0,04	0,05	0,08	0,1
Cinza (%)	0,7	0,9	0,8	0,5	0,7	0,6	0,8
pH	6,65 – 6,71	6,51 – 6,85	6,50 – 6,80	6 – 7	≤ 5	ND	ND

O leite revela-se uma importante fonte de minerais, tais como cálcio e fósforo, presentes em maior percentagem, mas também, de sódio, potássio, cloreto, iodo, magnésio e pequenas quantidades de ferro, influenciado pela presença de enzimas como a lactoferrina e xantina oxidase

transferase. O leite de ovelha caracteriza-se pela maior concentração de cálcio e de outros elementos minerais, enquanto o leite de cabra apresenta o valor mais baixo de ferro, zinco e cobre. Em contrapartida, o ferro é mais biodisponível no leite de cabra que no leite de vaca, uma vez que contém maior teor de nucleótidos que contribuem para uma maior absorção no intestino (Al-Wabel, 2008; Raynal-Ljutovac *et al.*, 2008).

Relativamente a vitaminas, estas estão presentes de forma significativa, tanto do tipo hidrossolúveis, como lipossolúveis. O leite de cabra e de ovelha apresentam elevada concentração de vitamina A em comparação com o leite de vaca e reduzida presença de β – caroteno visto esta ser transformado quase na sua totalidade em retinol (vitamina A). O leite de cabra é uma fonte importante de vitamina A, niacina, tiamina, riboflavina e ácido pantotênico, mas a concentração de vitamina B12 e ácido fólico, vitaminas muito importantes na nutrição humana, é 5 vezes menor que no produto bovino (Raynal-Ljutovac *et al.*, 2008).

2.1.1 Principais componentes do leite

2.1.1.1 Gordura

A parte lipídica do leite representa elevada importância no leite relativamente ao custo do mesmo, a nível nutricional, físico e às características sensoriais. É essencialmente constituída por triacilgliceróis (97 % - 98 %), contando também com a presença de fosfolípidos (0,1 % - 2 %), esteróis (0,2 % - 0,4 %) e quantidades vestigiais de vitamina A, D, E e K (Chandan, 1997).

Os sólidos gordos do leite estão presentes numa emulsão do tipo óleo em água, na forma de glóbulos microscópicos (diâmetro de 0,1 a 22 μ m). No leite de ovelha e de cabra estes são característicos num tamanho menor que 3,5 μ m, sendo que, em média os glóbulos de gordura de leite de ovelha são mais pequenos que os de cabra, apresentando 65% destes um diâmetro menor que 3 μ m (Mens, 1985).

Relativamente às características químicas da gordura presente no leite, é essencialmente saturada (65 %), com 38 % e 3 % de gordura monoinsaturada e polinsaturada, respetivamente. Quanto ao comprimento da cadeia de ácidos gordos, prevalecem os ácidos gordos de cadeia longa (C16 ou maior), seguido dos ácidos gordos de cadeia média, terminando com os de cadeia curta, com uma representatividade de 73 – 78 %, 15 - 20 % e 7 %, respetivamente (Chandan, 1997).

Os ácidos gordos cáprico (C10:0), láurico (C12:0), mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), esteárico (C18:0) e oleico (C18:1) representam mais de 75% dos lípidos totais dos leites de ovelha e cabra (Alonso *et al.*, 1999). A diferença mais significativa entre os leites de cabra e de ovelha é a presença em grande escala, no primeiro, de ácidos gordos de cadeia curta tais como ácido caproico, caprílico e cáprico (Jandal, 1996; Ceballos *et al.*, 2009). No caso do leite caprino, os ácidos gordos de cadeia curta (C4 – C8) estão esterificados na posição sn-3, enquanto os de cadeias mais longas (> C10) se encontram na posição sn-2 (Park *et al.*, 2007).

Os lípidos revelam elevada importância no *flavour* e nas propriedades reológicas dos produtos lácteos. Por outro lado, podem provocar características indesejáveis aos produtos, nomeadamente como precursores de compostos que provocam *off-flavours* (ranço hidrolítico e oxidativo) (Fox e McSweeney, 1998).

2.1.1.2 Proteína

As proteínas representam elevada relevância a nível nutricional e tecnológico nos produtos lácteos, apresentando-se como um grupo heterogêneo com diferentes composições e propriedades.

As proteínas mais representativas são as caseínas (α - α_{s1} , α_{s2} , β , κ , γ), as proteínas do soro (β -lactoglobulina, α -lactalbumina,), albumina sérica do sangue e imunoglobulinas - IgG₁, IgG₂, IgA e IgM, estando a primeira sensivelmente em maior concentração (Jenness, 1979; Amiot, 1991; Chandan, 1997; Fox e McSweeney, 1998). Estão também presentes no leite proteínas minoritárias importantes tais como a lactoferrina, a transferrina, a ferritina, a peptona-proteose, a calmodulina (proteína responsável pela ligação ao cálcio), a prolactina (proteína de ligação a folato), entre outras (Park *et al.*, 2007).

As micelas de caseínas são relativamente pequenas, com peso molecular de cerca de 20 a 25 kDa. Apresentam-se como uma fase micelar instável, composta por submicelas interligadas, fosfato de cálcio e pequenas quantidades de magnésio, sódio, potássio e citrato (figura 3), estas de aproximadamente 10⁶ Da e diâmetro de 10-15 nm (Fox e McSweeney, 1998). As referidas proteínas tendem a precipitar a pH 4,6 no caso de leite de vaca e a pH 4,1 na situação de leite de cabra, à temperatura ambiente, condições nas quais as proteínas do soro de leite se mantêm solúveis, a menos que previamente tenham sido desnaturadas por tratamentos térmicos ou outros (Amiot, 1991; Recio *et al.*, 1997; Ramos e Juarez, 2003)

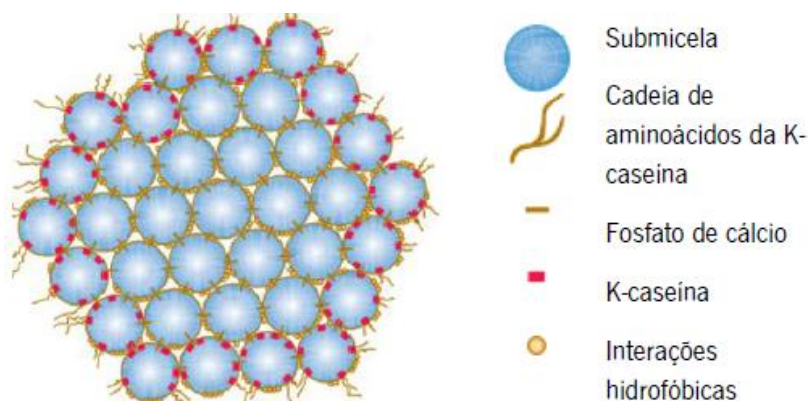


Figura 3 - Modelo de submicela da micela de caseína. (fonte: Bylund, 2003).

De entre as espécies referidas, o leite de ovelha é o que apresenta maior concentração de proteína total, 6,2% em relação aos 3,2% e 3,4% do leite de vaca e de cabra, respetivamente (Park *et al.*, 2007). Neste leite o componente abordado é responsável por 95% do azoto total, sendo os restantes 5% associados a azoto não proteico. No leite de cabra, a proporção de azoto não proteico é superior e a de caseína é inferior ao notado no leite ovino e bovino, o que, juntamente com diferenças no perfil das caseínas, está associada a baixo rendimento e estrutura no fabrico de queijo, bem como da textura fraca do iogurte, ao invés da boa e rápida capacidade de coagulação apresentada pelo leite de ovelha (Grandison, 1986; Guo, 2003; Park *et al.*, 2007).

As principais proteínas presentes nos leites abordados são, β -lactoglobulina, α -lactalbumina, caseína K, caseína β e caseína α_{s1} e caseína α_{s2} , notando-se naturalmente pequenas diferenças entre as espécies. Relativamente ao leite de cabra, em comparação com o leite de vaca, caseína α_{s1}

e a β -lactoglobulina estão em maior concentração no leite bovino, enquanto no leite caprino são mais representativas a caseína α_{s2} e a α – lactalbumina (Amiot, 1991; Park, 2006; Park *et al.*, 2007). No soro de leite, as proteínas com maior evidência são naturalmente as proteínas do soro de leite, não existindo diferença significativa entre a composição proteica entre os dois tipos de soro de leite (Jelen, 1992).

As micelas características de cabra e ovelha, semelhantes entre si, apresentam diferenças relativamente às associadas à vaca, quanto ao diâmetro médio, hidratação e mineralização, por norma superior nos leites caprinos e ovinos. As estruturas micelares caprinas contêm mais cálcio, fósforo inorgânico, são menos solúveis, menos estáveis ao calor e perdem submicelas mais rapidamente do que as micelas de caseínas de vaca (Park *et al.*, 2007).

2.1.1.3 Lactose

A lactose é o principal glúcido presente no leite (4,5 % - 4,9 %), existindo também pequenas quantidades de outros açúcares, tais como a glucose (50 mg/L), frutose, glucosamina, galactosamina, ácido neuramínico e oligossacarídeos neutros e ácidos. Este componente tem um papel importante no leite e nos produtos lácteos, tais como nos produtos fermentados. Contribui para o valor nutritivo, tem influência na textura, está envolvido em mudanças provocadas na cor e no sabor em produtos aquecidos a elevadas temperaturas (Fox e McSweeney, 1998) e é a principal fonte de energia do soro de leite (Fox *et al.*, 2000).

A lactose é um dissacarídeo composto por galactose e glucose, por ligação glicosídica β 1-4 (Fox e McSweeney, 1998) (figura 4). Este componente é encontrado no leite sob duas formas distintas, α e β , que se distinguem pela doçura e solubilidade. A forma α caracteriza-se como sendo menos solúvel e levemente menos doce que a forma β (Chandan, 1997).

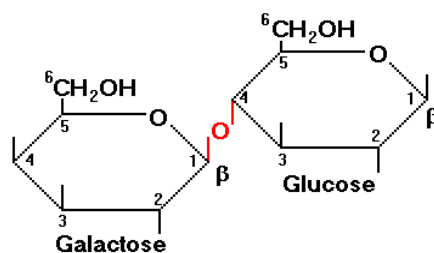


Figura 4 – Esquematização da ligação β 1-4 entre galactose e glucose - Lactose. (fonte: <http://bioquimicadanut.blogspot.com/2013/07/intolerancia-lactose.html> - 19/07/2018)

A observação da tabela 2, permite notar que o teor de lactose é semelhante em todas as espécies, o que no caso do leite de vaca e de cabra significa apenas uma diferença de 0,2-0,5% (Posati e Orr, 1976; Haenlein e Caccese, 1984; Chandan *et al.*, 1992). É possível também notar-se diferença quanto à concentração do referido nutriente entre o soro doce e ácido, o qual tem menor teor de lactose, dada a produção de ácido láctico a partir deste componente (Jelen, 1992).

2.2 Atividade microbiana

O leite e o soro de leite apresentam características, que os tornam um excelente substrato para o desenvolvimento de variados microrganismos quer desejáveis, como indesejáveis, tais como a composição nutricional rica, a elevada atividade da água e o pH com um valor próximo da neutralidade, (Arcuri *et al.*, 2006).

A contaminação existente no leite pode ser proveniente da glândula mamária, da superfície dos tetos e do úbere, dos equipamentos de ordenha e de armazenamento, bem como de vários fatores ambientais (Menezes *et al.*, 2014). Por essa razão é genericamente aceite que o ambiente do estábulo, a sala de ordenha e todos os equipamentos que entram em contacto com o leite devem estar em perfeitas condições higiénicas. Nesse sentido, é de elevada importância o controlo da temperatura e do tempo de armazenamento do produto (Fonseca, 1998)

Após a saída imediata do leite, de uma vaca saudável, a carga inicial é reduzida, sendo os microrganismos presentes essencialmente bactérias Gram-positivas tais como *Micrococcus spp.*, *Streptococcus spp.* e, em pequena percentagem, bactérias corineformes, tais como *Corynebacterium bovis*, mas também, com pequena representatividade, bactérias Gram-negativas e esporuladas (Ordoñez, 2005; Özer e Yaman, 2014).

Nota-se a proliferação em grande escala de microrganismos mesófilos e psicotróficos, (Zeni, 2013), merecendo também especial atenção as famílias *Enterobacteriaceae*, *Micrococcaceae* e *Streptococcaceae*. Os microrganismos da família *Enterobacteriaceae*, tais como coliformes termotolerantes (*E.coli*) são indicadores de contaminação fecal e a sua presença pode ser relacionada com bactérias patogénicas, com origem na secreção intramamária, na contaminação fecal do úbere ou através de equipamentos de ordenha (Tebaldi *et al.*, 2008; Menezes *et al.*, 2014).

Relativamente a fungos, com especial atenção para as leveduras, as respetivas enzimas alteram os componentes do leite, afetando a sua qualidade. Estes microrganismos demonstram também ter poder benéfico sob os produtos lácteos, podendo inibir ou eliminar microrganismos indesejáveis, comportando-se deste modo como culturas *starter* (Spanamberg *et al.*, 2004).

Quanto aos vírus, são poucos os géneros que provocam alterações nos produtos lácteos (Tronco, 2010), sendo também muito raros nas indústrias de laticínios, facilmente controlável com uma boa higienização do úbere antes e depois da ordenha (Hillerton *et al.*, 2001). Os vírus comportam-se como parasitas intracelulares, que embora não seja uma preocupação a sua multiplicação, podem sobreviver por um longo período de tempo (Koopmans e Duizer, 2004).

2.3 O Sistema Lactoperoxidase/Tiocianato

O sistema Lactoperoxidase/Tiocianato é um mecanismo bacteriostático e/ou bactericida natural não específico, capaz de garantir a destruição da maioria dos microrganismos, presentes nos leites de mamíferos (Modi *et al.*, 1991; Haddadin *et al.*, 1996; Barrett *et al.*, 1999; Sermon *et al.*, 2005).

A ativação deste sistema depende da presença e proporção das concentrações de três compostos que estão presentes naturalmente no leite, mas por norma não em quantidades suficientes: enzima lactoperoxidase, ião tiocianato (SCN^-), e peróxido de hidrogénio (H_2O_2) (Modi *et al.*, 1991; Fonteh *et al.*, 2002).

A eficácia do sistema para preservação do leite cru está dependente de numerosos factores, entre eles, o tipo e o número de microrganismos, a temperatura do leite, o tempo entre a ordenha e a ativação do sistema e a concentração molar de $\text{SCN}^-/\text{H}_2\text{O}_2$ (Gupta *et al.*, 1986). A concentração molar de $\text{SCN}^-/\text{H}_2\text{O}_2$ é variável com a ativação natural do sistema, a qual pode ser estimado através da monitorização da atividade da enzima lactoperoxidase e da quantificação do ião tiocianato durante o período de lactação. Dada a influência têm sido realizados diversos estudos com a finalidade de demonstrar a eficácia do sistema quando a concentração dos compostos integrantes é aumentada de forma exógena (Fonteh *et al.*, 2002).

As propriedades antimicrobianas do sistema advém da capacidade da enzima lactoperoxidase catalisar a reação de oxidação do tiocianato pelo peróxido de hidrogénio, dando origem a produtos intermédios com atividade antimicrobiana, sendo os produtos gerados em maior escala o ácido hipotiocianoso (HOSCN) e o ião hipotiocianato (OSCN^-) (Trujillo *et al.*, 2007).

O sistema lactoperoxidase/tiocianato é considerado economicamente favorável, principalmente para pequenos produtores, com quantidades de leite reduzidas, ou que se localizem em áreas de fornecimento de energia irregular, embora deva ser analisado caso a caso, dada a dificuldade de avaliar o benefício em comparação com técnicas que não são usados em determinada localização, à qual acrescem os custos, nomeadamente com energia, que são muito variáveis (WHO/FAO, 2005).

Para além do sistema em estudo existem outros mecanismos de imunidade inata do leite, tais como imunoglobulinas e proteínas não imunes (lactoferrina e lisozima) (Pakkanen e Aalto, 1997). Estudos recentes demonstraram que as proteínas do soro, como α -lactalbumina e β -lactoglobulina e hidrolisados de caseína, tais como compostos derivados de caseína α_{s1} , caseína α_{s2} , caseína β e caseína k, apresentam atividade antimicrobiana sob diversos tipos de bactérias patogénicas Gram-positivas e Gram-negativas, leveduras e fungos filamentosos (Haque e Chand, 2008).

2.3.1 Enzima Lactoperoxidase

No leite bovino, a lactoperoxidase é a segunda enzima mais abundante, seguida da xantina oxidase (Pruitt e Kamau, 1991; Wit e van Hooydonk, 1996) representando aproximadamente 1% das proteínas do soro de leite (Medina *et al.*, 1989; Althaus *et al.*, 2001). A enzima é sintetizada na glândula mamária e tem como principal função a catálise da oxidação de reações, entre o peróxido de hidrogénio e o tiocianato (Reiter e Härnult, 1984).

A concentração da enzima não é constante, independentemente da espécie animal, apresentando no caso bovino valor mínimo no colostro, mas com rápido aumento 3 – 5 dias após o parto (Korhonen, 1980; Reiter, 1985; Zapico *et al.*, 1990). Ao longo das 2 semanas seguintes nota-se a redução da concentração da enzima até um valor constante, cerca de 50% do valor máximo (Zapico *et al.*, 1990; Kussendrager e Van Hooijdonk, 2000)

O método de determinação da atividade da lactoperoxidase é um método colorimétrico, cujo fundamento é a oxidação de 2,2'-azino-di-(3-etil-benzotiazolino-6-ácido sulfônico) (ABTS) por peróxido de hidrogénio (Reiter e Härnult, 1984; Fonteh *et al.*, 2005;). Esta análise baseia-se numa determinação espectrofotométrica a 412 nm do composto de cor verde formado aquando da oxidação do ABTS. O grau de oxidação é diretamente proporcional à atividade da enzima (Marks *et al.*, 2001).

Na tabela 3, são discriminados os valores conhecidos para algumas espécies e raças.

Tabela 3 - Concentração média da enzima lactoperoxidase em leites de diferentes espécies/raças.

Tipo de leite	Lactoperoxidase (U/mL)	Referências
Bovino		
<ul style="list-style-type: none"> Holstein - Friesian (Centre for Dairy Research at the University of Reading) 	1,5 – 2,7 (2,3 ± 1,0)	(Fonteh <i>et al.</i> , 2002)
<ul style="list-style-type: none"> Romanian Simmental Cows 	(0,97 ± 0,012)	(Dumitraşcu <i>et al.</i> , 2012)
Ovelha		
<ul style="list-style-type: none"> Manchega 	0,14 – 2,38 (0,77)	(Medina <i>et al.</i> , 1989)
<ul style="list-style-type: none"> Manchega 	(3,46)	(Althaus <i>et al.</i> , 2001)
<ul style="list-style-type: none"> Merino Sheep 	(1,72 ± 0,05)	(Dumitraşcu <i>et al.</i> , 2012)
Cabra		
<ul style="list-style-type: none"> Híbrido (Espanha Central) 	(1,55)	(Zapico <i>et al.</i> , 1990)
<ul style="list-style-type: none"> (Reading, Reino Unido) 	0,04 – 0,16 (0,1±0,06)	(Fonteh <i>et al.</i> , 2002)
<ul style="list-style-type: none"> Verata 	(0,95)	(Zapico <i>et al.</i> , 1991)
<ul style="list-style-type: none"> <ul style="list-style-type: none"> Início de lactação 	0,03	(Zapico <i>et al.</i> , 1991)
<ul style="list-style-type: none"> Murciano – Granadina 	(2,15)	(Zapico <i>et al.</i> , 1991)
<ul style="list-style-type: none"> <ul style="list-style-type: none"> Início de lactação 	0,20	(Zapico <i>et al.</i> , 1991)
<ul style="list-style-type: none"> White Banat Goats 	(0,81 ± 0,05)	(Dumitraşcu <i>et al.</i> , 2012)
<ul style="list-style-type: none"> Alpine-Saanen (Quinta locais: Granja Joan Martí; L' Albió, Lleida) 	1,73	(Trujillo <i>et al.</i> , 2007)
<ul style="list-style-type: none"> Crioulo 	0,48 – 9,28 (4,45)	(Schoos <i>et al.</i> , 1999)
Búfalo	0,9	(Härnult e Kandasamy, 1982)
Humano		
<ul style="list-style-type: none"> Mães de Gambia (1 a 9 meses após o parto) 	0,06 – 0,97 (0,23)	(Reiter, 1985)

Mesmo dada a grande variabilidade de valores, todos se apresentam acima da concentração considerada como mínima para a existência de atividade do sistema lactoperoxidase/tiocianato, 0,02 U/mL (Reiter e Härnult, 1984). Esta variação pode ser justificável pela diversidade de condições dos ensaios (Dumitraşcu *et al.*, 2012) e pelo facto de enzima ser influenciada por características da espécie, da raça, pelo ciclo de lactação, pela estação do ano ou por características individuais (Medina *et al.*, 1989; Althaus *et al.*, 2001) e pela saúde do animal, tal como ocorre com outras enzimas nativas, a concentração desta varia na ocorrência de mastite, contudo não existe correlação

entre a lactoperoxidase e a presença de células somáticas (Whitaker, 2003). No caso específico do leite bovino a concentração de lactoperoxidase é igualmente influenciada pela alimentação e pelo teor de estrogénios (Medina *et al.*, 1989). A reduzida presença de lactoperoxidase no leite humano pode ser justificado pela atividade antimicrobiana do mesmo ser maioritariamente da responsabilidade de uma outra enzima, a mieloperoxidase, que deriva dos leucócitos (Medina *et al.*, 1989).

2.3.1.1 Propriedades físico-químicas

A enzima lactoperoxidase (EC 1.11.1.7) é uma metaloenzima (Modi *et al.*, 1991), pertencente à família das peroxidases (Reiter e Härnult, 1984), distribuídas de forma natural pela Natureza, nomeadamente em várias secreções de vertebrados, como em saliva e em lágrimas (Modi *et al.*, 1991; Sermon *et al.*, 2005). Apesar das enzimas presentes nas secreções referidas pertencerem à mesma família, peroxidases, por exemplo no caso das peroxidases da saliva estas apresentam características estruturais e catalíticas ainda um pouco distintas das da lactoperoxidase presente no leite de bovino: a enzima da saliva e a presente no leite humano são codificadas pelo mesmo gene, o que sugere serem iguais (Ihalin *et al.*, 2006). A mieloperoxidase de neutrófilos, a peroxidase de eosinófilos, a peroxidase da mucosa do intestino, a peroxidase uterina e a peroxidase da tiroide pertencem à superfamília II da peroxidase, associada a mamíferos, que se distingue da superfamília I da peroxidase associada a plantas, fungos e bactérias (Reiter e Härnult, 1984; Furtmüller *et al.*, 2002).

A lactoperoxidase é composta por uma cadeia polipeptídica conhecida de 612 resíduos de aminoácidos, com peso molecular de aproximadamente 78 000 Daltons e com pico de absorvância a 412 nm (Whitaker, 2003). No caso humano, é moderadamente catiônica, apresentando um ponto isoelétrico de aproximadamente pH 7,5 e no caso do bovino de pH 9,6 (Bafort *et al.*, 2014). Relativamente à sua estrutura e composição é considerada uma glicoproteína, constituída por 10% de glúcidos e com 5 possíveis ligações N-glicosídicas (Paul e Ohlsson, 1985). A molécula da enzima descrita apresenta no seu centro catalítico um grupo heme (protoporfirina IX de ferro), uma molécula de ferro para cada mol de proteína, ligado covalentemente à cadeia polipeptídica através de pontes dissulfeto, o que indica que não existem grupos tiol livres na molécula (Thanabal e La Mar, 1989; Ekstrand, 1994)

A enzima apresenta elevado grau de ligação com o ião cálcio, que se revela de grande importância na estabilidade da conformação molecular e na integridade estrutural da lactoperoxidase (Booth *et al.*, 1989).

2.3.1.2 Estabilidade

2.3.1.2.1 Temperatura

A lactoperoxidase é uma das enzimas presentes no leite consideradas mais estáveis a elevada temperatura, sendo por isso de grande interesse para a monitorização de tratamentos térmicos, nomeadamente para a distinção entre pasteurização e tratamento UHT (Fox e McSweeney, 1998; Whitaker, 2003; Dumitraşcu *et al.*, 2012).

Alguns estudos têm sido desenvolvidos no sentido de entender a influência do binómio tempo x temperatura sobre a enzima lactoperoxidase. É nesse sentido que vão os estudos realizados por Claeys *et al.* (2011), referente a leite de vaca, por Dumitraşcu *et al.* (2012) relativo a leite de bovinos, de caprinos e de ovinos, e por Trujillo *et al.* (2007), sobre leite de cabra. Estes demonstram que a inativação da enzima lactoperoxidase pode ser descrita por um modelo cinético de 1ª ordem, dado a crescente inativação da atividade da enzima lactoperoxidase, com o aumento da temperatura e do tempo, representando-se esta inativação por uma relação linear com elevado valor do coeficiente de correlação entre as variáveis.

A desnaturação térmica irreversível da enzima lactoperoxidase pode ser marcada por dois momentos distintos (Boscolo *et al.*, 2009), dada a existência de um conjunto de ligações covalentes, que protegem o “núcleo funcional”, o grupo heme, permitindo a resistência da enzima a elevadas temperaturas. A 40°C é afetada a região periférica da proteína sem efeito sobre a atividade catalítica da mesma, a 70°C é afetado o núcleo catalítico, provocando perda gradual da atividade, por iniciar-se a desnaturação da enzima (Herández *et al.*, 1990; Boscolo *et al.*, 2009), por sua vez, a 72°C verifica-se uma diminuição acentuada. Mesmo assim, numa exposição do produto a uma pasteurização rápida (HTST – High Temperature and Short Time), 72°C/74°C em 15 s, a lactoperoxidase presente no mesmo mantém atividade suficiente ($\approx 70\%$ da atividade original) para o processo de oxidação do tiocianato (Reiter e Härnult, 1984; Buys, 2011; Özer, 2014). Quando exposta a condições de binómio de tempo e temperatura correspondentes a pasteurização de longa duração (63°C durante 30 min) mantém a sua atividade inalterada. A inativação completa da enzima é identificada a 78°C após 15 s (Buys, 2011; Özer, 2014) e a desnaturação da mesma dá-se por completo quando aquecida a 80°C, por 2,5 s (Lorenzen *et al.*, 2010; Buys, 2011).

De modo distinto entre diferentes espécies, Dumitraşcu *et al.* (2012) afirma no seu estudo que a enzima lactoperoxidase presente nos leites de ovelha e de cabra é mais sensível ao calor, na faixa de temperatura mais baixa (70 a 75°C). Por outro lado, quando se refere a temperaturas superiores, a enzima é mais estável no leite de cabra, em detrimento dos leites de ovelha e vaca. A lactoperoxidase do leite de ovelha no estudo referido, de forma geral, apresenta-se como sendo a menos estável ao tratamento térmico (figura 5).

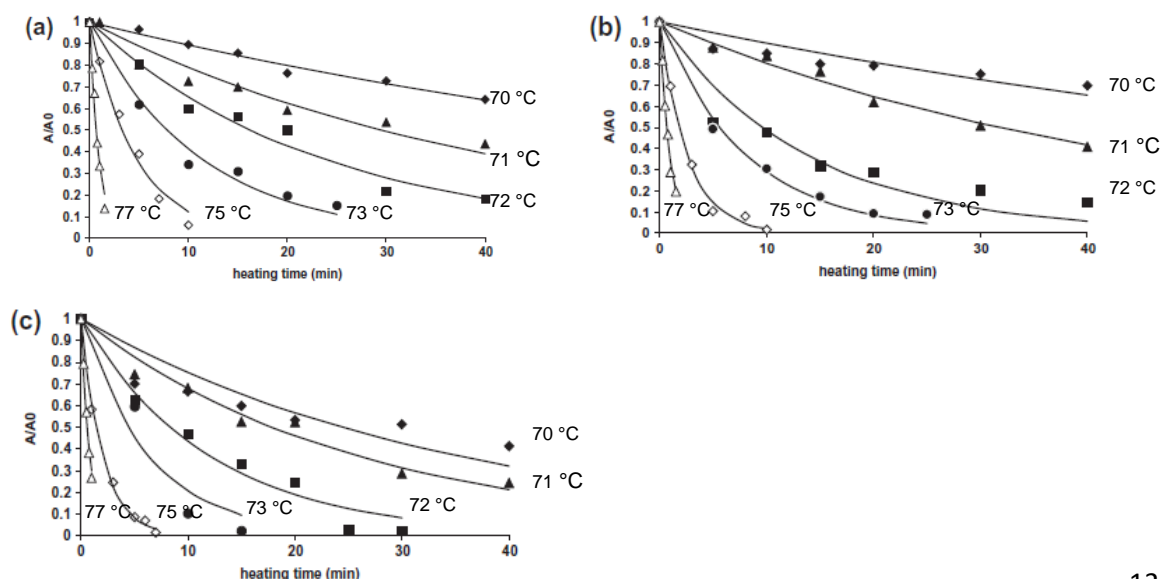


Figura 5 - Inativação da enzima lactoperoxidase a diferentes temperaturas (a) bovino; (b) caprino (c) ovino.

(adaptado de: Dumitraşcu *et al.*, 2012).

Os estudos relativos às diferenças de estabilidade térmica entre espécies não são conclusivos, pois segundo Lorenzen *et al.* (2010) um tratamento térmico a 75 °C por 28 segundos causa uma redução de atividade da enzima entre 50% a 60%, mas sem diferenças significativas entre as mesmas. Os resultados divergentes podem dever-se a diferenças na composição do leite e a propriedades moleculares da enzima

A lactoperoxidase demonstra ser mais instável em condições ácidas, colocando-se a hipótese de tal se dever à libertação de íão cálcio da molécula, atribuindo-se desta forma grande influência do referido íão relativamente à estabilidade térmica da enzima (Herández *et al.*, 1990).

2.3.1.2.2 pH

A concentração da enzima, teoricamente, influencia o modo como a mesma responde à variação de pH. Quando presente em baixa concentração (0,5 ppm), a um pH de 5,4 nota-se uma redução significativa da atividade da lactoperoxidase ($\approx 15\%$) passado 15 minutos, o que não se verifica em concentrações elevadas (>25 ppm), quando exposta durante 3h. Este facto pode-se dever à adsorção de enzima por parte das superfícies dos utensílios de vidro, recomenda-se, por isso, uma medição rápida após a diluição da enzima no meio. (Paul e Ohlsson, 1985; Herández *et al.* 1990; Wit e van Hooydonk, 1996; Buys, 2011)

Segundo Boscolo *et al* (2009), a lactoperoxidase nativa apresenta pouca alteração quando num meio de pH entre 4 e 10. A valores mais extremos de pH estão associadas perturbações intimamente associadas à porção heme e respetivas ligações éster, ligações essas que demonstram ser fundamentais para a integridade funcional e não estrutural da enzima, uma vez que a sua ruptura significa a inativação da enzima (Boscolo *et al.*, 2009). Esta ocorre a pH de 3 (Paul e Ohlsson, 1985; Herández *et al.*, 1990; Wit e van Hooydonk, 1996; Buys, 2011), mesmo que não represente a desnaturação da enzima (Boscolo *et al.*, 2009), a qual surge a pH inferior a 4 (Paul e Ohlsson, 1985; Herández *et al.*, 1990; Wit e van Hooydonk, 1996).

A atividade máxima da enzima lactoperoxidase, estudada com ABTS como substrato, é verificada a pH compreendido entre 5 e 6, consoante a concentração do substrato e de peróxido de hidrogénio (Bardsley, 1985; Buys, 2011). No caso da atividade da enzima ser observada diretamente no leite, a pH 5, é detetada uma atividade antimicrobiana ótima do sistema lactoperoxidase, dada a atividade máxima da enzima nessas condições e consequentemente existe maior produção de HOSCN/OSCN^- , tal como descreveu Buys (2011).

2.3.1.2.3 Outros condicionantes

A enzima lactoperoxidase apresenta-se muito resistente a enzimas proteolíticas (Buys, 2011; Özer, 2014), estando determinado que não é inativada pelas enzimas tripsina e termolisina, apenas muito lentamente a enzima quimotripsina apresenta capacidade de inativá-la (Paul e Ohlsson, 1985; Buys, 2011).

Por outro lado, aparenta ser muito sensível à luz, essencialmente na presença de riboflavina (Herández *et al.*, 1990; Buys, 2011; Özer, 2014). A lactoperoxidase presente no soro de leite e no leite é inativada em 55% e 75%, respetivamente, quando exposta a 6000 lux, por um período de 4h. A

inativação fotoquímica é irreversível, podendo ser quase completamente prevenida pela adição de cisteína (Herández *et al.*, 1990; Buys, 2011;).

Por sua vez, verifica-se o aumento da atividade da enzima na presença de lactose, proteína de soro de leite concentrada, sódio, magnésio e cloreto de cálcio, mas a presença de caseína provoca a diminuição da sua atividade (Özer, 2014).

2.3.2 Ião tiocianato

O ião tiocianato (SCN^-) está presente em tecidos e secreções de mamíferos, nomeadamente mamárias, salivares e nas glândulas da tiroide e suas secreções, em órgãos tais como o estômago e os rins e em fluidos, como o líquido sinovial, cerebral, cervical, espinhal, linfa e plasma (Reiter e Härnult, 1984).

As principais fontes de SCN^- são os glicosinolatos e os glicosídeos cianogénicos (Zapico *et al.*, 1991; Althaus *et al.*, 2001). Os primeiros apresentam elevada representatividade em produtos hortícolas, nomeadamente nas espécies do género *Brassicaceae* (família *Cruciferae*), como repolho, couve-de-bruxelas, couve-flor, nabo, formando tiocianato entre outros produtos de reação durante a sua hidrólise. A formação de tiocianato a partir de glicosídeo cianogénico dá-se pela hidrólise do mesmo, que é catalisada pela enzima rodonase (EC 2.8.1.1), encontrada no fígado, no rim e na tiroide, resultando em cianeto, que em reação com grupos tiosulfato (resultante do metabolismo de aminoácidos sulfurados) é desintoxicado pela conversão em tiocianato. Este composto é encontrado em milho, cana-de-açúcar, mandioca, batatas, ervilhas e feijões (Reiter e Härnult, 1984).

As concentrações de SCN^- no colostro e no leite são distintas, sendo mais representativas no primeiro, tal como ocorre nomeadamente com as proteínas do sangue e o sódio (Reiter e Perraudin, 1991). Variam também com a raça, com a espécie, com a saúde do úbere, fortemente com o regime alimentar do animal (Reiter, 1985; Everse *et al.*, 1990;), com o ciclo de lactação e com a atividade da enzima lactoperoxidase (Schoos *et al.*, 1999).

Relativamente à influência da alimentação animal, Reiter e Perraudin (1991) mencionam que bovinos de pastagens naturais com flora diversa, composta por gramíneas, ervas daninhas e trevos, apresentam um valor mais elevado deste composto do que em pastagens de flora pouco diversa, mesmo no Verão, ou do que bovinos alimentados de forma intensiva com *Brassicaceae* (Everse *et al.*, 1990). Verifica-se ainda que os bovinos produzidos em pastagens com flora variada conseguem atingir concentrações de ião tiocianato mais elevados do que leite de ovino, podendo até atingir valores superiores a 15 ppm na época de Verão (Medina *et al.*, 1989).

Ao longo do ciclo de lactação, nota-se variação na concentração de SCN^- , tal como se pode verificar na figura 6, para o caso de soro de leite caprino, sendo o primeiro e o sétimo mês os que apresentam concentração mais elevada e mais baixa, respetivamente. Schoos *et al.* (1999) especulam que a variação ao longo dos meses de lactação seja dependente da fisiologia da glândula mamária, que afecta a síntese e transporte do tiocianato até aos alvéolos.

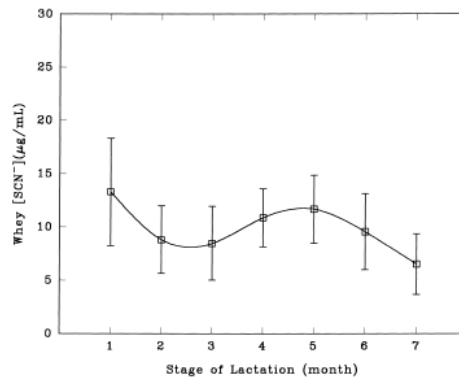


Figura 6 - Tiocianato contido no soro de leite em cada mês de lactação. (fonte: Schoos *et al.*, 1999).

A atividade da lactoperoxidase é referida como parâmetro influenciador da concentração do ião apresentado pois, tal como se verifica na figura 7, os dois compostos comportam-se de forma proporcionalmente inversa no soro de leite. Tal fenómeno é esclarecido para o caso de leite de cabra por Schoos *et al* (1999), como maior utilização de substrato, maior oxidação de tiocianato, quando se verifica atividade enzimática mais intensa, mesmo que na presença de reduzida quantidade de H_2O_2 . Estando neste sentido a concentração de SCN^- também dependente da concentração de peróxido de hidrogénio, quanto maior for a quantidade naturalmente presente e/ou menor for a quantidade de H_2O_2 destruído por catálise, maior é a quantidade disponível para a ativação do sistema lactoperoxidase.

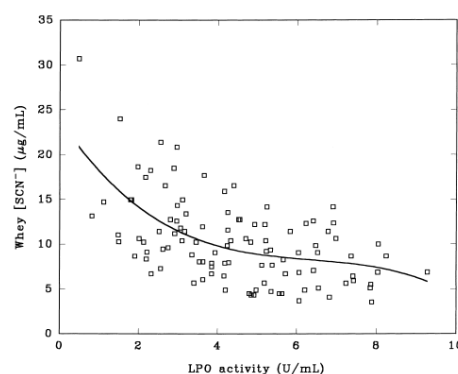


Figura 7 - Relação entre a concentração de tiocianato no soro de leite e a atividade da enzima lactoperoxidase.

(fonte: Schoos *et al.*, 1999).

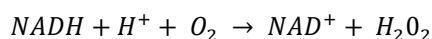
A quantidade do composto presente no leite por vezes não é suficiente para a ativação do sistema lactoperoxidase, tal como também se pode verificar pelos valores apresentados na tabela 4, nem sempre é superior a 10–25 ppm (Whitaker, 2003), concentração de tiocianato considerado mínima para o efeito. Posto isto, por vezes adota-se a adição do ião, na forma de tiocianato de sódio, para que o sistema apresente mecanismo bacteriostático ou bactericida.

Tabela 4 - Concentrações médias de ião tiocianato em leites de diferentes espécies/raças.

Tipo de leite	Tiocianato (ppm)	Referências
Vaca Holstein - Friesian (Centre for Dairy Research at the University of Reading)	6 – 10,2 (8,5 ± 5,1) 3,2 – 4,6	(Fonteh <i>et al.</i> , 2002) (Björck <i>et al.</i> , 1979)
Ovelha • Manchega • Manchega	0,4 – 20,6 (10,3) (6,89)	(Medina <i>et al.</i> , 1989) (Althaus <i>et al.</i> , 2001)
Cabra • Híbrido (Espanha Central) • (Reading, Reino Unido) • Verata • Murciano – Granadina • Creole	0,67 – 11,17 (4,03) 6,6 – 8,2 (7 ± 2,59) (5,76) (3,20) 3,54 – 30,69 (10,29)	(Zapico <i>et al.</i> , 1990) (Fonteh <i>et al.</i> , 2002) (Zapico <i>et al.</i> , 1991) (Zapico <i>et al.</i> , 1991) (de Schoos <i>et al.</i> , 1999)
Búfalo	5,4 5.- 6	(Seifu <i>et al.</i> , 2005) (Härnult and Kandasamy, 1982) (Thakar and Dave, 1986)
Humano	2,6	(Metwally and Nasr, 1992)

2.3.3 Peróxido de hidrogénio

O terceiro constituinte do sistema lactoperoxidase/tiocianato é o peróxido de hidrogénio. Este composto é gerado de forma natural pelo processo de fagocitose de leucócitos polimorfonucleares e, no caso de condições aeróbias, através do metabolismo de bactérias lácticas (Medina *et al.*, 1989), como *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Streptococcus* (Björck *et al.*, 1975), via oxidação de NADH catalisada por NADH-oxidase, que por sua vez, poderá sofrer catálise, ou participar na oxidação de uma nova molécula de NADH. A equação representativa do processo descrito é apresentada seguidamente (Hoogendoorn *et al.*, 1977):



O H₂O₂ pode também ter origem exógena, nomeadamente adicionando diretamente o mesmo, ou por adição de formas geradoras de peróxido de hidrogénio, como percarbonato de sódio, aquando do contacto com a água (Marks *et al.*, 2001), peróxido de magnésio (Reiter e Perraudin, 1991), oxidação de ácido ascórbico, oxidação de glicose pela glicose oxidase, oxidação de hipoxantina pela xantina oxidase (Klebanoff *et al.*, 1966) e oxidação aeróbia dependente de manganês, ou de nucleotídeos de piridina reduzidos pela ação de peroxidases metálicas (Klebanoff *et al.*, 1966; Wolfson e Sumner, 1993; Althaus *et al.*, 2001). A concentração de peróxido de hidrogénio é de igual forma dependente da presença/atividade dos microrganismos de catalase positivos, que apresentam capacidade de degradação do H₂O₂, com consequente formação de água e oxigénio (Gupta *et al.*, 1986).

Quando se tem em vista a ativação do sistema lactoperoxidase, este composto deve estar numa concentração entre 8 e 10 ppm, aproximadamente 100 vezes menos, que quando adicionado de forma independente (Gupta *et al.*, 1986; <http://www.fao.org/docrep/v6200t/v6200t0t.htm>).

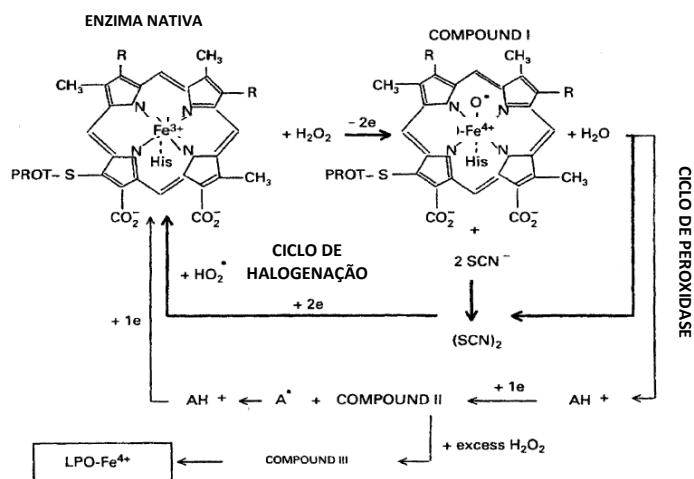


Figura 8 - Mecanismos de reação da catálise pela lactoperoxidase. (adaptado de: Kussendrager e Van Hooijdonk, 2000).

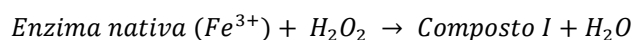
2.3.4 Mecanismo de reação do sistema lactoperoxidase/tiocianato

Os mecanismos de reação envolvidos no sistema antibacteriano lactoperoxidase/tiocianato envolvem os mecanismos enzimáticos, de catálise da oxidação pela lactoperoxidase, bem como os mecanismos de peroxidação do tiocianato e de alguns halogêneos, do qual resultam as espécies que apresentam propriedades bactericida ou bacteriostático sobre crescimento de espécies de microrganismos. Estes mecanismos revelam-se de elevada complexidade (Kussendrager e Van Hooijdonk, 2000).

2.3.4.1 Mecanismo enzimático

A reação de catálise pela lactoperoxidase segue diversos caminhos, que podem ser acompanhados, consoante a concentração de peróxido de hidrogénio e de dadores de electrões, por diversos estados de oxidação da enzima lactoperoxidase (figura 8) (Wit e van Hooydonk, 1996). Tal como outras peroxidases hemoproteicas, a lactoperoxidase tem capacidade de existir em vários estados de oxidação, sendo conhecidos diferentes estados intermédios: peroxidase férrica (enzima nativa), composto I, composto II e composto III (Pruitt e Kamau, 1991).

O mecanismo enzimático inicia-se com a transformação da enzima nativa (Fe^{3+}), conjugado com o H_2O_2 , formando o composto I e água, segundo a seguinte reação:

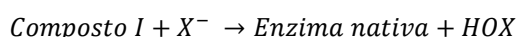


Nesta reação a enzima nativa sofre oxidação de 2 electrões, pelo peróxido de hidrogénio, estando um no centro do oxiferro heme e o outro como catião orgânico localizado no anel da porfirina (Battistuzzi *et al.*, 2010).

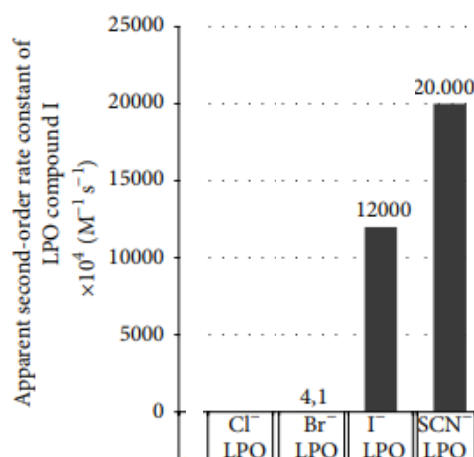
O composto I não é específico como dador de electrões, pelo que o seguimento do ciclo depende das formas químicas presentes no meio. Tendo em conta que o composto é extremamente instável, na ausência de um agente redutor, um resíduo de aminoácido da apoproteína é oxidado.

Desta reação resulta o isômero do composto I, o qual é parecido com o composto II quanto ao estado redox do ferro e à sua incapacidade de reagir com halogêneos (Furtmüller *et al.*, 2006)

Após a formação do composto I, a reação pode seguir pelo ciclo de halogenação, ou pelo ciclo de peroxidase. O caminho seguido depende essencialmente da quantidade de substrato, resultando ambos os ciclos na recuperação de enzima nativa (Bafort *et al.*, 2014). A presença de halogênios (Br^- , I^-) ou de pseudo-halogênios (SCN^-) em grande quantidade inibe a formação de composto II, levando à formação, a partir de composto I, de enzima nativa (Ghibaudi e Laurenti, 2003; Tahboub *et al.*, 2005), segundo a reação apresentada seguidamente. O composto I é reduzido, pela transferência de 2 electrões, provocando uma nova formação de enzima nativa e de um composto fortemente oxidante e com atividade antimicrobiana (Pruitt e Tenovuo, 1985).



A taxa de redução do composto I deriva de vários factores, nomeadamente do potencial redox da enzima, o qual deve ser igual ou superior ao do substrato, bem como do composto química em questão, ou seja, a lactoperoxidase oxida de forma mais eficiente o ião tiocianato, uma vez que este é o seu substrato fisiológico, seguido do ião iodeto e de forma mais lenta o ião brometo, não apresentando capacidade de oxidação do ião cloreto (Furtmüller *et al.*, 2002; Arnhold *et al.*, 2006) (figura 9).



LPO: Lactoperoxidase; Cl^- : ião cloreto; I^- : ião iodeto; SCN^- : ião tiocianato

Figura 9 - Taxa de reação entre o composto I da enzima lactoperoxidase com halogênios e pseudo-halogênios.

(adaptado de: Bafort *et al.*, 2014).

A concentração do composto I/enzima nativa e HOX/X^- depende das concentrações dos reagentes e do pH do meio. Tal como se pode observar na figura 10, o aumento de pH provoca a diminuição da concentração dos reagentes, favorecendo a formação de HOX e de enzima nativa. É, igualmente, possível observar, que existe um valor de pH, acima do qual a oxidação dos halogénios (especialmente com elevado potencial de redução como o Cl^-) é termodinamicamente desfavorável (Arnhold *et al.*, 2006)

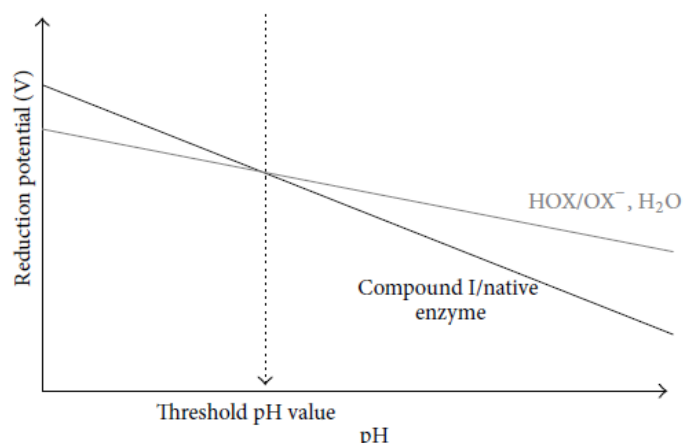
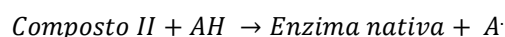
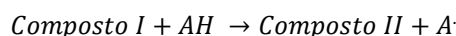


Figura 10 - Relação da concentração dos reagentes/produtos. Indicação do pH limiar.

(fonte: Bafort *et al.*, 2014).

Por outro lado, na presença de quantidade insuficiente de halogénios ou de SCN^- de potencial redox apropriado pode desenvolver-se o ciclo peroxidase, no qual o composto I, por intermédio de duas reduções sucessivas, com ganho de um eletrão por parte da enzima em cada reação, forma primeiramente o composto II (Chance, 1952; Yamazaki *et al.*, 1959) forma instável (Tahboub *et al.*, 2005) e inativa reversível da lactoperoxidase (Seifu *et al.*, 2005), consequentemente a enzima nativa, com a formação de um radical livre em cada reação, a partir do substrato (Chance, 1952; Yamazaki *et al.*, 1959). As equações seguintes são representações do referido anteriormente:



O potencial de redução *standard* do par composto I/composto II é elevado, o que permite assumir que o composto I não apresenta um agente redutor específico, oxidando inúmeros substratos orgânicos e inorgânicos (Tahboub *et al.*, 2005; Davies *et al.*, 2008). Por outro lado, o potencial de redução do par composto II/enzima nativa é reduzido, o que reduz o número de possíveis substratos da segunda reação apresentada, ou seja, a natureza dos substratos influencia bastante a capacidade destes serem oxidados pelo par referido, para além de que estes, dado o potencial de redução, não reagem preferencialmente com os compostos halogénios. Por esta razão, o composto II e a reação de formação da enzima nativa são vistos como ponto limitante do sistema lactoperoxidase/tiocianato, por representarem o ponto de ligação entre o ciclo de halogenação e de peroxidase, dada a necessidade da realização do ciclo de halogenação para a produção de compostos com características antimicrobianas (Tahboub *et al.*, 2005).

Como foi referido anteriormente, os intervenientes no sistema lactoperoxidase/tiocianato são os moderadores do mesmo. Neste caso, o ião tiocianato tem grande influência na reação de formação de enzima nativa a partir do composto II, pois a concentrações elevadas de SCN^- a taxa de formação do composto II torna-se mais reduzido que a formação de enzima nativa, verificando-se de

igual modo uma redução do tempo de vida do mesmo (Tahboub *et al.*, 2005), tal como se pode notar na figura 11.

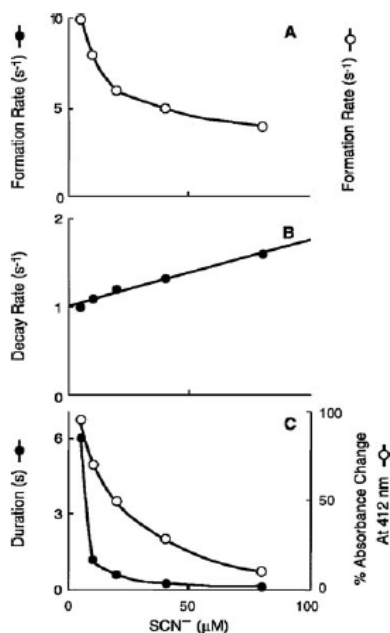


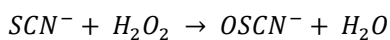
Figura 11 - Taxa de formação (A), decaimento e duração (C) de composto II em função de SCN⁻.
(fonte: Tahboub *et al.*, 2005).

Na presença de concentração em excesso de H₂O₂, em comparação com a concentração de enzima lactoperoxidase e sem a presença exógena de doadores de eletrões, o composto II dá origem ao composto III, forma inativa da enzima. Segundo Kohler *et al* (1988) e Kohler e Jenzer (1989) o composto III apenas é irreversível aquando da presença de grande excesso de peróxido de hidrogénio, devido à clivagem do grupo prostético e libertação do ferro heme. Na presença de uma diferença de concentração menos significativa, mesmo na ausência de um dador de eletrões, o composto III é convertido lentamente na enzima nativa, embora apenas dois terços da enzima inicial.

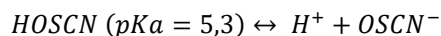
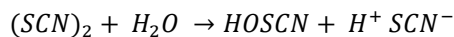
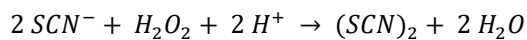
2.3.4.2 Peroxidação do ião tiocianato

A peroxidação do ião tiocianato é uma reação de oxidação de SCN⁻, pelo peróxido de hidrogénio, catalisada pela enzima lactoperoxidase ativa, na forma de composto I, a qual pode desenvolver-se de duas formas distintas (Whitaker, 2003):

1. Oxidação do SCN⁻ direta para OSCN⁻ (Pruitt and Tenovou, 1982), quando se está na presença de elevada concentração de peróxido de hidrogénio (Pollock e Goff, 1992), pela seguinte reação (Whitaker, 2003):



2. Oxidação do SCN^- , com produção de tiocianogênio $(\text{SCN})_2$, que se hidrolisa rapidamente com a formação de ácido hipotiocianoso (HOSCN), o qual se apresenta em equilíbrio com OSCN^- ($\text{pKa} = 5,3$) (Whitaker, 2003):



Schoos *et al.* (1999), no seu estudo relativamente a cabras de raça crioula, estabeleceu correlações entre a concentração OSCN^- , H_2O_2 , SCN^- e a atividade da enzima lactoperoxidase. Verificou uma relação proporcionalmente inversa entre a concentração de tiocianato presente no soro de leite e a atividade da enzima (figura 12), o que pode levar a concluir que elevada atividade de lactoperoxidase representa o aumento da oxidação de tiocianato e consequentemente elevada produção de OSCN^- (figura 13), não existindo qualquer tipo de correlação entre este e a concentração de ião tiocianato.

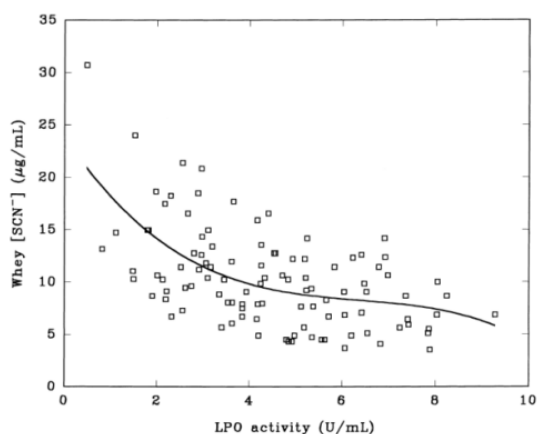


Figura 13 - Relação entre o ião tiocianato e a atividade da enzima lactoperoxidase presentes no soro de leite de cabras da raça Crioulo.

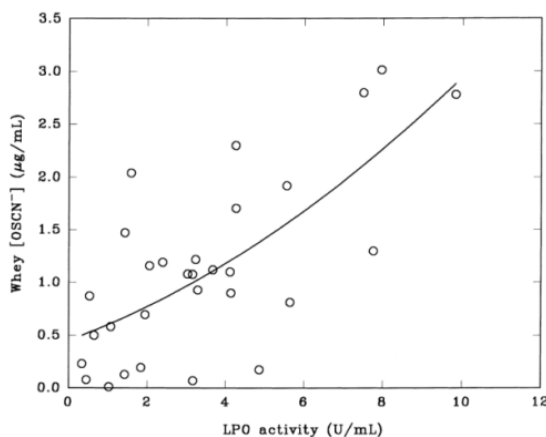


Figura 12 - Relação entre o ião hipotiocianato e a atividade da enzima lactoperoxidase presentes no soro de cabras da raça Crioulo.

(fonte: Schoos *et al.*, 1999).

Para além desta constatação, verifica-se ainda que mesmo na presença de baixa atividade de enzima lactoperoxidase e de uma concentração de peróxido de hidrogénio suficiente, grande quantidade de tiocianato é oxidada num curto período de tempo. Deste modo, percebe-se que SCN^- não é um fator limitante para a reação de oxidação, mas que é a enzima que tem um papel determinante na quantidade de produto resultante da oxidação do ião tiocianato (Schoos *et al.*, 1999).

O conjunto de reações que envolvem a formação de espécies químicas com características antimicrobianas é extremamente complexo e apesar do ião hipotiocianato (OSCN^-) ser o composto com maior representatividade, verifica-se a produção de outros produtos intermédios de curta vida, nomeadamente ácido hipotiocianoso (HOSCN). Este produto juntamente com OSCN^- são os mais conhecidos como agentes de atividade antimicrobiana, sendo o ácido hipotiocianoso o mais bactericida. A reação, e consequentemente o produto final que daí advém está dependente das condições do meio, no qual ocorre (Hogg e Jago, 1970; Björck e Claesson, 1980).

É neste sentido que vão os resultados de Björck e Claesson (1980), nos quais se verifica o rápido efeito bactericida do sistema lactoperoxidase/tiocianato contra *E.coli* 9703, estando a bactéria praticamente inibida após 60 minutos, apresentando o OSCN^- uma concentração de cerca de 60 % da inicial. Os mesmos autores verificaram a relação entre a diminuição da concentração de SCN^- e a formação de OSCN^- , durante a reação de oxidação catalisada pela enzima lactoperoxidase, cujos resultados podem ser analisados na figura 14. Neste estudo foram adicionadas concentrações crescentes de H_2O_2 , para valores de tiocianato e enzima lactoperoxidase fixos de 0,25 mM e 5 $\mu\text{g/mL}$, respetivamente. A observação da figura permite tirar a ilação, tal como os autores explicam, que a concentração reduzida de peróxido de hidrogénio, por cada mole deste é formado 1 mol de OSCN^- , por outro lado, para concentrações elevadas de H_2O_2 , não se verifica qualquer tipo de relação linear entre os compostos, embora se note grande efeito bactericida.

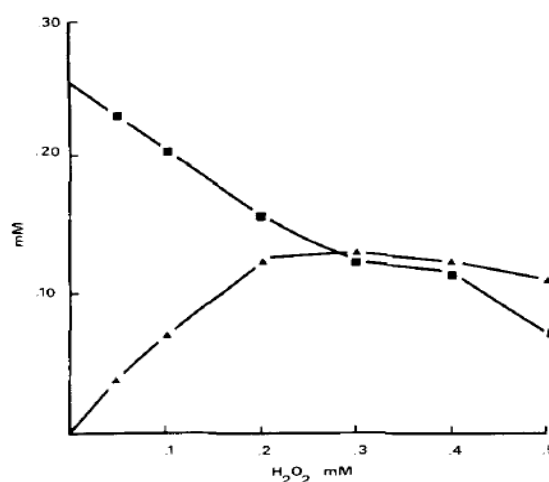


Figura 14 - Relação entre formação de OSCN^- e diminuição da concentração de SCN^- na oxidação do mesmo, catalisada pela enzima lactoperoxidase. (fonte: Björck e Claesson, 1980).

Os resultados apresentados sugerem que a catálise do ião tiocianato provoca a formação de outros compostos, para além do ião hipotiocianato, com características irreversíveis de inibição ou efeito bactericida sob bactérias gram-negativas, tais como *E.coli* (Björck e Claesson, 1980).

Apesar do estudo referido ser desenvolvido num meio de pH 6,7 (Björck e Claesson, 1980), existem evidências que tais espécies químicas são sintetizadas em condições de meio de pH neutro e na presença de excesso de H_2O_2 (Pruitt *et al.*, 1982), o que, em condições normais do leite, deixa de ter significado para o mesmo. Por outro lado, ao considerar-se um pH de 6,5 como normal para o leite, o ácido hipotiocianoso é dissociado, existindo desta forma principalmente ião hipotiocianato como produto da oxidação do tiocianato (Aune e Thomas, 1978; Pruitt *et al.*, 1982; Codex Alimentarius, 1991). Estas formas encontram-se em equilíbrio a pH entre 5 e 8. Num meio de pH ácido, mesmo que não tendo significância no leite, todos os compostos são instáveis, sendo os compostos $(SCN)_2$ e $HOSCN$ decompostos em CN^- e o ião hipotiocianato rapidamente oxidado pela presença em excesso de H_2O_2 , podendo desenvolver compostos como sulfato, amoníaco, ou dióxido de carbono, compostos estes que podem contribuir para os efeitos tóxicos deste sistema. (Aune e Thomas, 1978; Pruitt *et al.*, 1982; Pruitt e Tenovou, 1982). Para além do pH, existem outros factores que influenciam os compostos formados aquando da oxidação do ião tiocianato, tal como a luz, iões metálicos, a concentração e a temperatura que afetam a estabilidade do ião hipotiocianato (Hoogendoorn *et al.*, 1977).

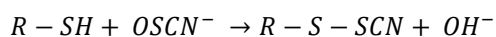
Para além dos compostos anteriormente referidos, é também considerado por Pruitt *et al.* (1982) que o composto $(SCN)_2$, apesar de ser um composto instável em solução aquosa e provavelmente não se acumular na mistura da reação, apresenta igualmente características antibacterianas.

2.3.4.3 Oxidação dos grupos sulfidrilos

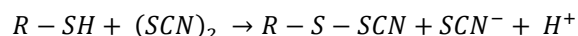
O efeito antibacteriano do sistema, de uma forma geral, advém da interação dos compostos antimicrobianas com grupos SH livres de várias enzimas e proteínas bacterianas presentes na membrana celular interna, levando à inibição da atividade de enzimas presentes no citoplasma responsáveis pela respiração e metabolismo, tais como enzimas glicolíticas, provocando a inibição da produção de ácido láctico e transporte de hidratos de carbono e aminoácidos, bem como a inibição da síntese de proteínas DNA e RNA, causando em último caso a lise celular (Gupta *et al.*, 1986; Whitaker, 2003; Hawkins, 2009).

A oxidação dos grupos sulfidrilos tanto pode ocorrer por intermédio do ácido hipotiocianoso como pelo ião hipotiocianato, apesar das membranas apresentarem permeabilidades distintas aos compostos, ainda que pouco permeáveis ao $OSCN^-$ (Whitaker, 2003).

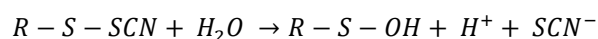
Numa primeira fase, a oxidação dos grupos sulfidrilos desenvolve-se pela rápida reação do ião hipotiocianato ou do ácido hipotiocianoso com os grupos sulfidrilos, promovendo a produção de tiocianato de sulfenilo ($R-S-SCN$), pelas seguintes equações (Thomas e Aune, 1978):



Como foi referido existem outros compostos com atividade antimicrobiana, no caso específico do tiocianogênio a reação é a seguinte:



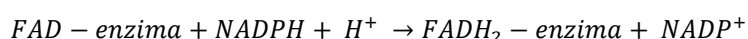
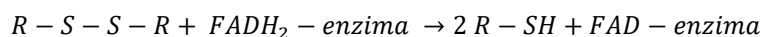
Após a formação de tiocianato de sulfenilo, este pode ser hidrolisado, existindo a formação de ácido sulfónico (R-S-OH):



Na presença de um meio com baixa concentração de grupos sulfidrilos o tiocianato de sulfenilo pode reagir no sentido da formação de dissulfetos mistos. Por outro lado, na presença de elevada concentração destes grupos, R-S-SCN pode ser novamente reduzido a grupo sulfidrílo (R-SH) (Pruitt e Kamau, 1991).

2.3.4.4 Reação das células ao sistema lactoperoxidase/tiocianato

A resposta da célula à ação do sistema revela-se muito complexa, dependente das espécies bacterianas, das concentrações dos agentes oxidantes e da flexibilidade metabólica da célula para reduzir os grupos tiol oxidados. A flexibilidade metabólica da célula baseia-se na capacidade que esta tenha de sintetizar metabolitos capazes de reduzir os grupos tiol, por intermédio de uma enzima FADH₂, seguindo-se a reação de NADPH com o produto da reação anterior. As equações seguintes ilustram o referido:



Em forma de resumo, a oxidação de NADH pela formação de peróxido de hidrogénio, estimula a oxidação de grupos tiol, que por sua vez leva à redução de moléculas NADPH. Deste modo, a célula permanece imune à inibição do metabolismo celular, tanto quanto a mesma conseguir adaptar a relação entre NADH e NADPH. Considerando o metabolismo acima explicado, consegue-se perceber que as células na ausência de açúcar são mais suscetíveis ao sistema lactoperoxidase, uma vez que a glicólise, dependente de NADP⁺, é a fonte mais importante de NADPH (Hoogendoorn *et al.*, 1977)

Tendo em conta o referido anteriormente, a inibição reversível é favorecido após o esgotamento dos compostos antimicrobianos, tendo as células capacidade de se recuperarem. No mesmo sentido, o efeito provocado pela oxidação pode ser revertido pela adição de agentes redutores, que contenha grupos sulfidrilos, tais como compostos tiol, como glutatona ou cisteína, por tamponamento do ião hipotiocianato, resultando numa nova formação de sulfidrílo. Por outro lado, a inibição torna-se irreversível quando existe um longo período de incubação e elevada concentração

dos compostos com características antimicrobianas. (Kussendrager e Van Hooijdonk, 2000; Whitaker, 2003).

O sistema lactoperoxidase revela-se como um antimicrobiano natural, de amplo espectro para segurança e preservação do leite, dada a sua ação sob vírus, fungos, parasitas e bactérias (Naidu, 2000). Relativamente à atuação do sistema sobre bactérias este pode ser classificado de bactericida ou de bacteriostático consoante o efeito provocado nas células, o qual também depende do tipo de dador de eletrões, da temperatura, do tempo de incubação, da concentração dos constituintes do sistema, da permeabilidade da célula, da densidade da célula, sendo a eficácia do sistema inversamente proporcional, (Naidu, 2000; Seifu *et al.*, 2005; WHO/FAO, 2005), do pH, que em condições aproximadamente neutras (pH de 6,6 a 6,8), no qual OSCN⁻ é o principal produto de oxidação, como referido anteriormente, o sistema exerce um efeito essencialmente bacteriostático, enquanto com a redução de pH, o ácido hipotiocianoso revela-se em maior concentração, revelando o elevado poder antibacteriano deste, verificando-se o aumento do efeito bactericida do sistema (Reiter e Härnult, 1984) e da concentração microbiana, apresentando efeito bactericida aquando de uma contaminação reduzida (10^2 ufc/mL) e efeito bacteriostático a um nível de microrganismos superior ($10^6 - 10^7$ ufc/mL) (Wolfson e Sumner, 1993; WHO/FAO, 2005).

As bactérias demonstram sensibilidade diferente consoante o grupo ao qual pertencem, o que pode ser explicado por diferenças na estrutura da parede celular e suas diferentes propriedades de barreira (Björck *et al.*, 1975; Reiter e Härnult, 1984; Seifu *et al.*, 2005), mas também consoante a fase de crescimento na qual se encontram, embora este fator não seja unânime. Özer (2014) afirma que são mais sensíveis ao efeito bactericida, bactérias que se encontrem na fase de crescimento exponencial, do que as que se encontrem na fase estacionária, enquanto Sandholm *et al.* (1988) afirma o inverso. Bactérias Gram-negativas, catalase positivas, tais como pseudomonas, coliformes e salmonelas podem ser inibidas pelo sistema, mas também mortas, consoante as condições do meio e na presença de concentrações elevadas de peróxido de hidrogénio (Björck *et al.*, 1975; Reiter e Härnult, 1984; Seifu *et al.*, 2005). Por outro lado, as bactérias Gram-positivas, catalase negativas, como por exemplo *Streptococce* e *Lactobacilli*, são por norma apenas inibidas, sendo as barreiras celulares deste grupo mais efetivas que as do referido anteriormente (Oram e Reiter, 1966; Reiter e Härnult, 1984). Relativamente à atividade antifúngica do sistema lactoperoxidase/tiocianato, tal como referem Doyle e Marth (1978), este apresenta ação de degradação diretamente sobre aflotoxinas. Por sua vez, o efeito causado do sistema em vírus, com halogenetos como dadores de eletrões, é verificado tanto em poliovírus como em vírus de vacinação (Belding *et al.*, 1970).

2.4 Efeito da aplicação do sistema lactoperoxidase/tiocianato

2.4.1 Efeitos tóxicos sobre os consumidores dos produtos lácteos

Todos os componentes intervenientes no sistema lactoperoxidase/tiocianato são metabolitos humanos normais, pelo que existem vários estudos que indicam que não existe problema a longo prazo no consumo de produtos lácteos tratado pelo sistema, desde que sejam seguidas as diretrizes do *Codex Alimentarius* (Fernández *et al.*, 2005; WHO/FAO, 2005).

Ermans *et al.* (1972) num estudo realizado com ratos, com um consumo elevado de SCN^- (1 a 5 mg/dia) declararam que o consumo excessivo de SCN^- pode estar associado ao bócio (ou pressão de hiperatividade da glândula da tiroide), e que também aumenta o nível plasmático, verificando-se maior atividade do sistema renal. Numa corrente inversa, Dahlberg *et al.* (1984) afirmaram que com a ingestão de 8 mg de ião tiocianato por dia (20 mg/L de SCN^- em 400 mL de leite) não se verificaram efeitos aparentes no funcionamento da tiroide, mas existiu um aumento dos níveis séricos e do funcionamento do sistema renal. É importante ter em conta que o estudo foi desenvolvido com pessoas saudáveis, sendo, deste modo, ainda desconhecido o efeito provocado pela adição de tiocianato em pessoas com distúrbios na glândula da tiroide. No mesmo sentido, Lijinsky e Kovatch (1989) concluíram que em ratos um consumo de 0,32% de SCN^- dissolvido em água, não apresenta risco cancerígeno.

Relativamente ao peróxido de hidrogénio, o motivo de alerta deve-se à sua capacidade oxidativa, o que naturalmente não se reflete unicamente nos microrganismos, podendo também afetar as células humanas. Neste sentido, o sistema lactoperoxidase sobressai relativamente ao método de utilização única de peróxido de hidrogénio (300-800 mg/kg), uma vez que utiliza quantidades mínimas em relação a este, para além de que, pela utilização e consequente catálise deste componente pelo sistema lactoperoxidase/tiocianato, este apresenta também um carácter protetor das células (Adamson e Carlsson, 1982; Hanstrom *et al.*, 1983; FAO, 1990).

Como se sabe, os produtos com carácter antimicrobiano, capacidade oxidativa, são os produtos resultantes da oxidação do ião tiocianato, que por sua vez têm um tempo de vida curto pela oxidação que sofrem (Haddadin *et al.*, 1996), sendo também bastante instáveis à temperatura. Deste modo, assume-se que os níveis residuais destes produtos não apresentam risco toxicológico, para além disso, diversas secreções, tais como a saliva, apresentam mecanismos de defesa próprios (Reiter, 1984).

Concluindo, alguns dos maiores estudos realizados sobre este método de conservação do leite, por um período de 10 anos e referente ao tratamento de 800 milhões de litros, concluíram que não se verificam efeitos negativos do consumo de leite tratado segundo o método descrito no guia *Codex Alimentarius – Guidelines for the preservation of raw milk by use the lactoperoxidase system* (Fernández *et al.*, 2005)

2.4.2 Efeitos nos componentes nutricionais, tecnológicos e sensoriais dos produtos lácteos

A aplicação do sistema lactoperoxidase/tiocianato provoca algumas alterações na componente nutricional do leite, o que por sua vez significa condições físico-químicas irregulares nos produtos lácteos que deles advém (Özer, 2014).

O leite, como foi referido anteriormente, revela-se uma importante fonte nutricional, principalmente em países em desenvolvimento. Neste sentido a aplicação do sistema em estudo assume-se muito importante pela redução de perdas de leite, por um controle da carga microbiana na ausência de outro processo mais satisfatório. Apesar disso, a ativação do mesmo também traz custos a nível da componente nutricional do leite, pela redução de folato, embora a mesma não seja considerada relevante, por este produto não ser assumido como uma fonte significativa desta vitamina (WHO/FAO, 2005). Relativamente a questões tecnológicas e sensoriais do leite e de produtos lácteos a partir dele produzidos, ao contrário do que teoricamente era espectável pela junção dos efeitos causados por possíveis oxidações provocadas pela ativação do sistema e fenómenos microbiológicos, diversos estudos demonstram que na prática essas alterações não ocorrem (Ponce *et al.*, 2005)

O leite tratado pelo sistema lactoperoxidase/tiocianato demonstra menor carga bacteriana, prevenindo o crescimento de bactérias psicrófilas (Björck *et al.*, 1975), sem provocar alterações a nível físico-químico, nem tornando bactérias resistentes ao sistema (Seifu *et al.*, 2005; WHO/FAO, 2005). A pasteurização torna-se mais eficiente com a utilização do processo abordado, provavelmente pela redução da resistência térmica dos microrganismos (Sarkar e Misra, 1994) ou mesmo apenas pela menor presença microbiana levando a que o leite de vaca, de cabra e de ovelha apresentem maior período de validade (Kamau *et al.*, 1991; Haddadin *et al.*, 1996). A utilização dos dois processos poderá permitir a utilização de temperaturas mais baixas, o que possibilita maior qualidade de produtos sensíveis ao calor e evita a perda de nutrientes, sem deixar de se alcançar o objetivo (Doores e Pruiwt, 1990).

A produção de fórmulas de leite reconstituído para crianças a partir de leite com o sistema lactoperoxidase/tiocianato ativado revela-se de extrema importância, pela elevada capacidade inibitória deste sob a bactéria *Cronobacter sakazakii*, representando desta forma o consumo de fórmulas seguras (Özer, 2014).

Seifu *et al* (2004) demonstraram que o queijo de cabra Gouda, produzido a partir de leite de cabra tratado pelo sistema lactoperoxidase/tiocianato apresenta melhor qualidade microbiológica e *flavour*, não se sentindo efeito na composição química do leite. Ressalvam a utilização de culturas *starter* adequadas, dado o elevado poder inibitório sobre estas, que consequentemente leva à menor produção de ácido e problemas de coagulação em produtos ácidos gelificados (Seifu *et al.*, 2003). Lara *et al* (1978) revelam que a produção de queijo fresco de vaca a partir de leite tratado pelo método em estudo apresenta maior rendimento e fixação de gordura, assim como no geral, embora tenha uma taxa de desenvolvimento de ácido mais lenta; retém menos humidade, que não se reflete significativamente na textura final, e não apresenta alteração no pH nem diferenças nas características sensoriais do produto (Seifu *et al.*, 2005).

Relativamente ao iogurte, é possível verificar a interação entre a enzima lactoperoxidase e grupos sulfidrilos das proteínas, o que pode levar a uma redução de interação entre β -lactoglobulina e caseína β , provocando alterações de textura do mesmo (WHO/FAO, 2005). No mesmo sentido, a ativação do sistema lactoperoxidase/tiocianato pode causar o prolongamento do tempo de fermentação, necessário para a gelatinização das caseínas (Namba, 1990). Por outro lado, a ativação do sistema a 10°C, com a consequente atividade residual da lactoperoxidase, pode ser benéfica no sentido de controlo da produção de ácido, sem apresentar efeito bacteriostático sobre as bactérias lácticas, obtendo-se um produto com menor acidez no qual não é afetada a contagem de células viáveis (Nakada *et al.*, 1996).

Apesar do referido, Ponce *et al.* (2005) sugerem que o sistema lactoperoxidase/tiocianato não exerce efeitos negativos na qualidade do queijo e produtos fermentados quando o leite é submetido a tratamento térmico adequado. Nesse sentido e tendo em conta o abordado, WHO/FAO (2005) assumem que os efeitos causados sob os processos tecnológicos dos produtos lácteos não são limitantes, não existindo qualquer resultado seriamente negativo sobre os produtos.

Também nas questões sensoriais, nutricionais e tecnológicas dos produtos lácteos o sistema em estudo apresenta vantagens sobre a utilização de peróxido de hidrogénio de forma isolada, em doses excessivas ao necessário para alcançar o mesmo objetivo. Relativamente ao sabor, a questão é ambígua, existindo estudos que apontam para que o leite não retenha sabores anómalos após a catálise completa do H_2O_2 (Luck, 1962), enquanto outros autores, apontam para sabor insatisfatório nos queijos produzidos com leite tratado por peróxido de hidrogénio (Kosikowski, 1977; Jha, 1984). Quanto à componente nutricional, verificam-se alterações no seu perfil, nomeadamente com perdas no valor biológico das proteínas e na disponibilidade de determinados aminoácidos (Deodhar e Mehta, 1980). Verifica-se também uma pequena variação na quantidade de vitaminas, que se torna mais drástica na presença de maior concentração de H_2O_2 e a temperaturas mais elevadas, sendo as vitaminas mais afetadas o ácido ascórbico e a vitamina B_1 ; as vitaminas lipossolúveis não são significativamente afetadas, colocando-se a hipótese dos glóbulos de gordura se comportarem como uma camada protetora das mesmas. Por sua vez, as características dos produtos lácteos também são alteradas, nomeadamente a textura, dado o carácter oxidativo, quando presente em elevadas concentrações, sob as caseínas e as proteínas do soro de leite, formando produtos tais como aldeídos, cetonas e ácidos (Luck, 1962).

2.5 Outros processos de controlo microbiológico

Como é normal, o sistema em estudo não se revela perfeito, pelo que seguidamente são apresentados outros processos de controlo microbiológico, ou outras formas de utilizar o sistema lactoperoxidase/tiocianato, de forma a encontrar o método de conservação mais adequado para o fim pretendido.

2.5.1 Microfiltração

O processo de microfiltração é uma técnica de separação, um processo de membranas, cujo tamanho dos poros pode variar entre 0,05 μm e 5,00 μm e em que as pressões transmembranares são geralmente baixas, de 0,5 – 3 bar (Nobrega *et al.*, 2005). Este processo é capaz de separar partículas com tamanho compreendido entre 0,025 μm e 10 μm , sendo por isso uma das características deste processo a capacidade de remover bactérias, esporos e células somáticas do leite e do soro de leite, sem aumento da temperatura, ajudando deste modo a manter a composição nutricional dos produtos. São-lhe, no entanto, também atribuídas desvantagens, pois dado o tamanho variado das células microbianas e dos esporos, pode-se verificar a permanência de 0,1-1% de microrganismos iniciais no permeado (<https://www.milkpoint.com.br/colunas/rafael-fagnani/microfiltracao-em-produtos-lacteos-principios-e-aplicacoes-99178n.aspx>). Também a semelhança entre o tamanho dos glóbulos de gordura e o de alguns microrganismos torna a microfiltração apenas eficiente para a produção de leite desnatado (WHO/FAO, 2005).

Esta metodologia é de adoção pouco provável em países em desenvolvimento onde a refrigeração é igualmente difícil de implementar por razões económicas/técnicas (WHO/FAO, 2005).

2.5.2 Centrifugação de alta velocidade

A centrifugação de alta velocidade é um processo que permite a separação de componentes de uma amostra numa interação de densidade dos mesmos e a força centrífuga, numa centrífuga a uma velocidade superior a 5000 rpm (<http://www.rsc.org/publishing/journals/prospect/ontology.asp?id=CMO:0002013&MSID=b9nr00256a>).

É uma metodologia que se baseia num processo físico, utilizado na indústria de laticínios para diminuir a carga bacteriana e de esporos (bactofugação). Porventura, é um processo de difícil aplicabilidade em países em desenvolvimento, pela sua complexidade técnica.

2.5.3 Processamento de alta pressão hidrostática

O processamento de alta pressão hidrostática é uma metodologia não térmica na qual o produto é exposto a pressões entre 400 – 800 MPa (WHO/FAO, 2005). Este processo leva a variadas alterações no leite, nomeadamente à inativação de microrganismos e de enzimas, à desnaturação de proteínas do soro de leite e à fragmentação irreversível das micelas de caseína (Huppertz, 2010).

Atualmente, o processamento de alta pressão ainda não é utilizado de forma comercial, dado os seus elevados custos. Apesar disso, revela-se de grande interesse tecnológico em comparação com os tratamentos térmicos atuais, os quais provocam a desnaturação de proteínas bioativas e a inibição de microrganismos vantajosos ao processamento dos produtos lácteos (Huppertz, 2010).

2.5.4 Refrigeração e ativação do sistema lactoperoxidase/tiocianato

Esta metodologia prevê a utilização conjunta de ambos os processos tirando partido dos benefícios de cada um deles. Ou seja, a refrigeração tem um conhecido efeito inibitório sob os microrganismos mesófilos, mas dada a temperatura verifica-se um possível desenvolvimento dos microrganismos psicrotróficos, que podem ter grande impacto nas características físico-químicas e sensoriais do leite, pela produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas termorresistentes (Zeni, 2013). Assim sendo, e tendo em conta o que foi referido anteriormente quanto à capacidade inibitória do sistema lactoperoxidase/tiocianato sob os microrganismos que se desenvolvem a temperaturas entre 0 e 7°C, nota-se neste processo uma mais-valia para a conservação do leite cru, pela atuação simultânea em grupos que se desenvolvem a temperatura análogas, notando-se um prolongamento do período de vida útil em 2 ± 2 dias (Pokhrel and Das, 2014)

Este procedimento poderá se revelar inacessível aos países em desenvolvimento ou em zonas onde a utilização de refrigeração de forma isolada não seja possível.

3 Objetivos e delineamento experimental

Como referido, o trabalho teve como objetivo principal a avaliação da utilização da ativação do sistema lactoperoxidase/tiocianato para conservação de leite cru de pequenos ruminantes (leite de ovelha e leite de cabra) bem como de soro de leite de cabra ou de mistura (vaca e cabra).

O interesse particular do desenvolvimento deste tema advém do facto de em muitas situações as dificuldades de acesso à energia elétrica ou os custos inerentes à refrigeração de pequenas produções em regiões difíceis, de baixa densidade populacional, dificultam a utilização das regras estabelecidas para a conservação do leite. A consequência é, muitas vezes, nestas situações, o recurso a processos não autorizados de conservação do leite, como é o caso da utilização de peróxidos de hidrogénio como conservante, processo ciclicamente assunto de notícias, frequentemente associado a importantes regiões queijeiras do nosso país.

Foram efetuados ensaios de conservação de leites de cabra e de ovelha, bem como de soro de leite de mistura e de cabra, ao longo dos quais foi efetuada a monitorização da evolução da componente microbiana, do pH e da acidez, ao longo do tempo, entre 1 e 2 dias ou ao longo de 1 dia, conforme descrito no capítulo seguinte.

Os ensaios de conservação de leite e de soro de leite foram efetuados em duplicado, a 15°C, com a dosagem recomendada pela FAO e com o dobro da mesma dosagem, tomando como controlo a refrigeração (6°C). Foi ainda efetuado um ensaio de conservação a 30°C, com ativação do sistema em estudo.

4 Materiais e métodos

4.1 Leite e soro de leite

Para os ensaios foram utilizados leites de ovelha, de cabra e soro de leite de cabra e de mistura (cabra e vaca), das seguintes fontes: Cooperativa de Produtores de Leite de Cabra Serrana (LEICRAS), Associação Nacional Criadores Ovinos Serra da Estrela (ANCOSE), Associação Nacional de Caprinicultores da Raça Serrana (ANCRAS), Queijos Santiago, Herdade da Amendoeira, Mértola, Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária - Pólo de Santarém.

Na impossibilidade de estarem disponíveis amostras de leite recolhidas e utilizadas imediatamente após a ordenha, como é aconselhado designadamente para se dar início ao processo de ativação do sistema lactoperoxidase/tiocianato com vista à conservação a temperatura ambiente, todas as amostras e lotes de leite e soro de leite utilizados foram congelados (-18°C) após a recolha, tendo sido descongelados imediatamente antes da utilização.

4.2 Determinações analíticas

4.2.1 Caracterização dos produtos em estudo

4.2.1.1 Composição físico-química e pH

Numa primeira fase, com o intuito de caracterizar a composição química dos leites de ovelha (21 amostras), cabra (25 amostras), soro de leites de cabra (11 amostras) e de mistura (7 amostras) em estudo relativamente aos teores de tiocianato foram determinados os teores em gordura, proteína, lactose, sólidos totais e sólidos não gordos. A determinação foi efectuada segundo a norma IDF 141C:2000, utilizando o equipamento Milkoscan 133 B (Foss, Denmark), para o qual as amostras têm de ser mantidas a 40 °C, segundo o manual do equipamento. Foi também determinado o pH das amostras, a 20 °C, por potenciometria, com um potenciómetro Metrohm 713 (Herisau, Switzerland).

4.2.1.2 Concentração de tiocianato

No sentido de conhecer as concentrações médias de tiocianato dos produtos em estudos, procedeu-se à determinação do teor deste, segundo a metodologia descrita pelo guia *Codex Alimentarius – Guidelines for the preservation of raw milk by use the lactoperoxidase system*, utilizando o espectrofotómetro, modelo U-2010 (HITACHI, Japan), modificada para acomodar as diferenças na composição do leite de ovelha em relação ao leite de vaca, para qual o guia utilizado está indicado. Para a curva padrão, foram utilizadas as seguintes concentrações de tiocianato: 5 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL, 20 µg/mL e 30 µg/mL. Na execução da metodologia foram duplicadas as quantidades de leite indicadas (4 mL de leite, 4 mL de água destilada e 4 mL de TCA 20%); para determinação do teor em tiocianato da amostra o valor obtido da curva padrão foi multiplicado pelo fator 2.

A determinação da concentração de tiocianato é feita por intermédio de uma reta de calibração que estabelece a correlação entre a variação de absorvância e a concentração de tiocianato presente nas amostras analisadas. O desenvolvimento do trabalho prático levou a duas

retas de calibração, pela utilização de dois lotes distintos de nitrato de ferro, seguidamente apresentadas na figura 15 e 16.

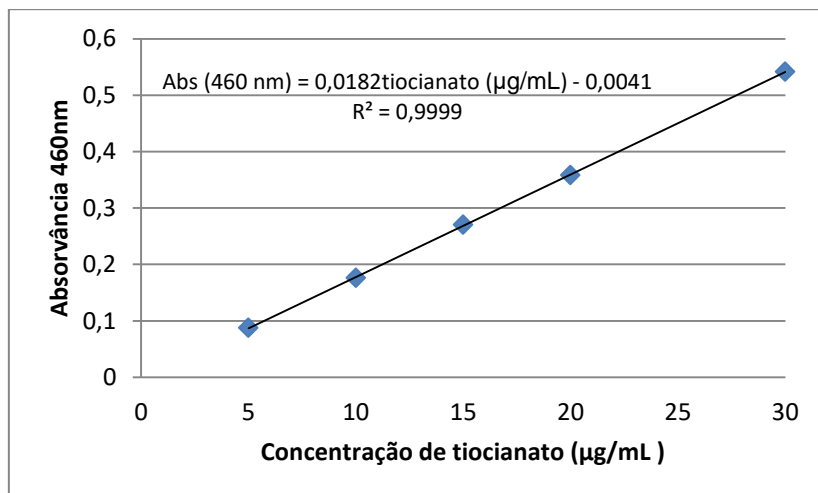


Figura 15 - Curva de calibração para a determinação da concentração de tiocianato e respetiva equação ($y = 0,0182x - 0,0041$; $R^2 = 0,9999$, onde y representa a absorvância e x a concentração de tiocianato ($\mu\text{g/mL}$)).

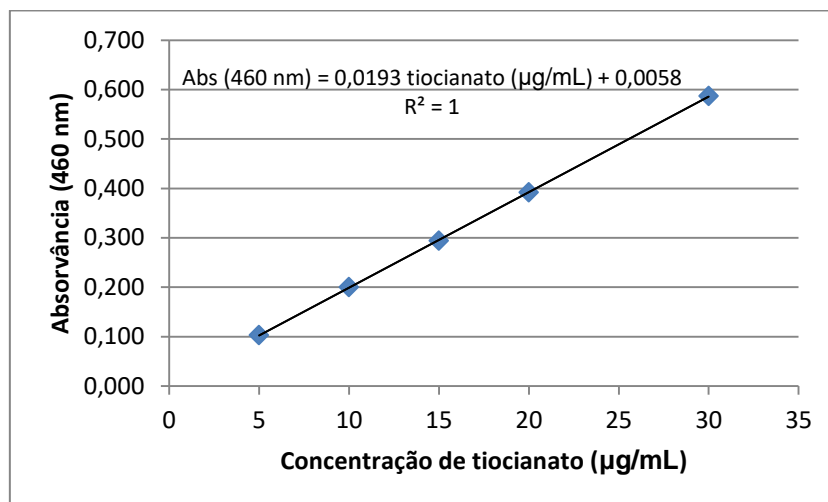


Figura 16 - Curva de calibração para a determinação da concentração de tiocianato e respetiva equação ($y = 0,0193x - 0,0058$; $R^2 = 1$, onde y representa a absorvância e x a concentração de tiocianato ($\mu\text{g/mL}$)).

4.3 Comparação de procedimentos de conservação

Na segunda fase, implementaram-se ensaios de combinação de adição de percarbonato de sódio e tiocianato de sódio, com a intenção de avaliar a eficiência da conservação do leite, em relação à temperatura e à concentração dos referidos compostos, utilizando-se em alguns ensaios as concentrações indicadas pelo guia *Codex Alimentarius* e noutros ensaios o dobro dos mesmos. A monitorização da eficiência dos fatores foi feita por análises microbiológicas (contagem de *Enterobacteriaceae*, de microrganismos mesófilos e de psicrotróficos), bem como por determinação do pH e da acidez titulável. Como complemento foi efetuada a determinação da concentração de peróxido de hidrogénio no leite após adição de percarbonato de sódio e tiocianato de sódio.

Os ensaios efetuados ao longo do estudo com leite de ovelha, cabra e soro de leite de mistura (vaca e cabra), com duas réplicas de cada, utilizaram temperaturas de conservação de 15°C (amostra de controlo, adição dos componentes químicos em dose simples e em dose dupla) e 6°C, como amostra de controlo representando a conservação por refrigeração. Para cada um dos leites ou soros de leites e cada um dos ensaios prepararam-se em 4 frascos de Schott 100 mL do mesmo lote, cada um dos quais colocado posteriormente nas diferentes condições de teste durante 2 dias.

Suplementarmente, com o objetivo de acompanhar a evolução da qualidade microbiológica de leite de cabra e de soro de leite de cabra em função dos diferentes métodos de conservação efetuaram-se alguns ensaios com determinações de acidez titulável e pH de hora a hora, ao longo de um período máximo de 26 horas (sendo que não foram realizadas medições durante a noite). Realizaram-se três ensaios com leite de cabra, dois deles nas seguintes condições: controlo T 6°C, controlo T 15°C, aditivos T 15°C, aditivos x2 T 15°C, nos quais o pH e a acidez titulável foram determinados de hora a hora até às 6^h horas, com determinações suplementares à 24^a hora num dos ensaios e à 26^a hora noutro dos ensaios. No terceiro ensaio as amostras (controlo, aditivos, aditivos x2) foram mantidas à temperatura de 30°C, com a intenção do ensaio decorrer em condições extremas. Com soro de leite foi realizado um único ensaio suplementar com determinações efetuadas de hora a hora durante as primeiras 7 horas, com a última determinação após 24 horas, com as seguintes amostras, controlo T 6°C, controlo T 15°C, aditivos T 15°C, aditivos x2 T 15°C. Nas figuras 17 e 18 é esquematizado o referido anteriormente.

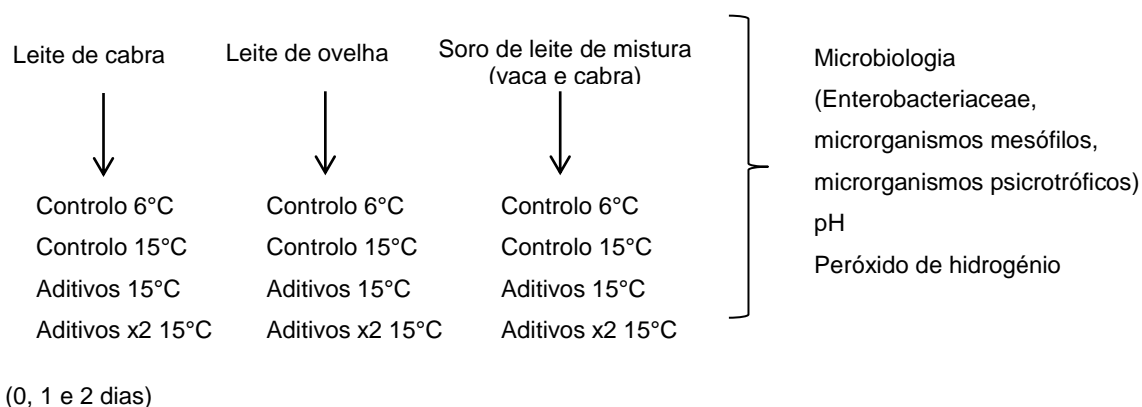


Figura 17 - Esquematização da metodologia de comparação de procedimentos de conservação pela análise da evolução microbiológica, do pH e da acidez titulável.

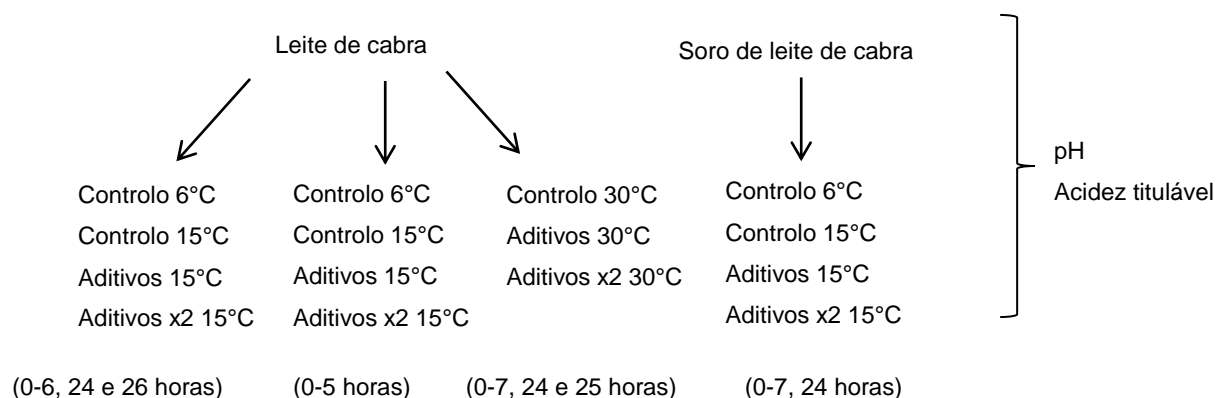


Figura 18 - Esquematização da metodologia de comparação de procedimentos de conservação pela análise da evolução do pH e da acidez titulável.

4.3.1.1 Componente Microbiana

As amostras destinadas à avaliação da componente microbiana foram submetidas a, contagem de microrganismos a 30°C segundo a norma ISO 4833-1:2013, a contagem de *Enterobacteriaceae* segundo a norma ISO 21528-2:2004 e a contagem de psicrótrófos segundo a norma ISO 6730/IDF 101:2005.

4.3.1.2 pH e acidez titulável

O conjunto das medições realizadas nos ensaios de conservação incluíram também a determinação da acidez, segundo a NP-470 Determinação da acidez e do pH por potenciometria, utilizando um potenciómetro de modelo Metrohm 654 (Herisau, Switzerland).

4.3.1.3 Determinação do teor de peróxido de hidrogénio

A avaliação da concentração de peróxido de hidrogénio no leite e no soro de leite foi realizada, após 15 minutos da adição de percarbonato de sódio e tiocianato de sódio, através do método colorimétrico com utilização de bandas MQuant (Merck KGaA * Darmstadt * Germany)

4.4 Tratamento Estatístico

A análise estatística foi realizada utilizando o *software* STATISTICA 8.0 (StatSoft, Inc 1984-2007). A comparação entre tratamentos foi efetuada através da análise de variância (ANOVA), utilizando como fatores o método de conservação e o tempo de conservação. A comparação entre grupos foi efetuada utilizando o teste Fisher, avaliando a existência de diferenças significativas entre as médias ($p < 0,05$).

5 Resultados e discussão

5.1 Caracterização dos produtos em estudo

5.1.1 Composição físico-química

Os resultados obtidos para a composição físico-química dos leites e soros de leites utilizados são apresentados na figura 19, na forma de gráfico de barras.

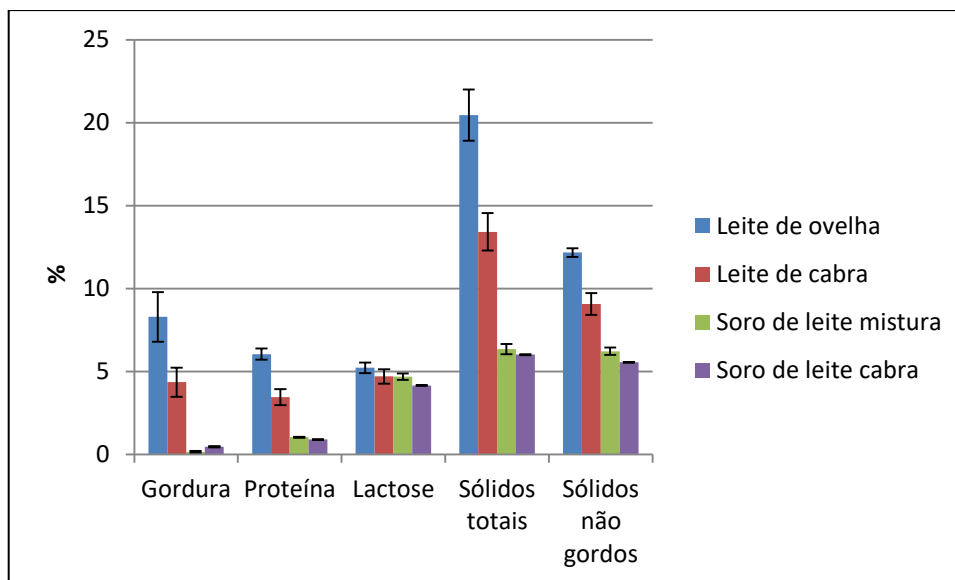


Figura 19 - Caracterização físico-química dos produtos leite de ovelha, leite de cabra e soro de leite de cabra e de mistura (vaca e cabra), quanto aos teores em gordura, proteína, lactose, sólidos totais e sólidos não gordos.

O leite de ovelha apresenta os valores médios de 8,29%, 6,04%, 5,22%, 20,46% e 12,17% para os teores em gordura, proteína, lactose, sólidos totais e sólidos não gordos, respetivamente. Relativamente ao leite de cabra os valores médios dos parâmetros analisados, na sequência apresentada na figura são 4,35%, 3,45%, 4,70%, 13,42%, 9,07%. Quanto ao soro de leite, os valores médios determinados para os mesmos parâmetros são 0,15%, 1,03%, 4,69%, 6,35% e 6,22% no caso do soro de leite de mistura (vaca e cabra) e 0,46%, 0,90%, 4,15%, 6,01% e 5,55% para o soro de leite de cabra.

Os valores obtidos encontram-se dentro dos valores estabelecidos como médios na bibliografia, como pode ser confirmado na revisão bibliográfica, na figura 2. Como era expectável, o leite de ovelha apresenta maior concentração de todos os componentes analisados, com exceção do teor de lactose que é muito semelhante entre os leites estudados. A composição do soro de leite reflete a condição de subproduto do fabrico de queijo, com teores em proteína e em matéria gorda substancialmente inferiores aos do leite.

É reconhecida a influência da origem das amostras nos componentes constituintes do leite, relacionado com a espécie, com a variação de dieta, com a raça e/ou com as condições ambientais (Park, 2006). Deste modo, verifica-se menor desvio padrão no soro de leite de cabra, cujas amostras analisados são provenientes da mesma região, associado igualmente à reduzida quantidade de amostras analisadas. Por outro lado o maior desvio padrão é notado nas amostras de leites de ovelha

e cabra, cujas amostras são de origens distintas, essencialmente notado no componente gordura e consequentemente nos sólidos totais, extremamente influenciados pela alimentação dos animais.

Na figura 20 são apresentados os resultados médios obtidos para o pH das diferentes amostras, bem como os respetivos desvios-padrão.

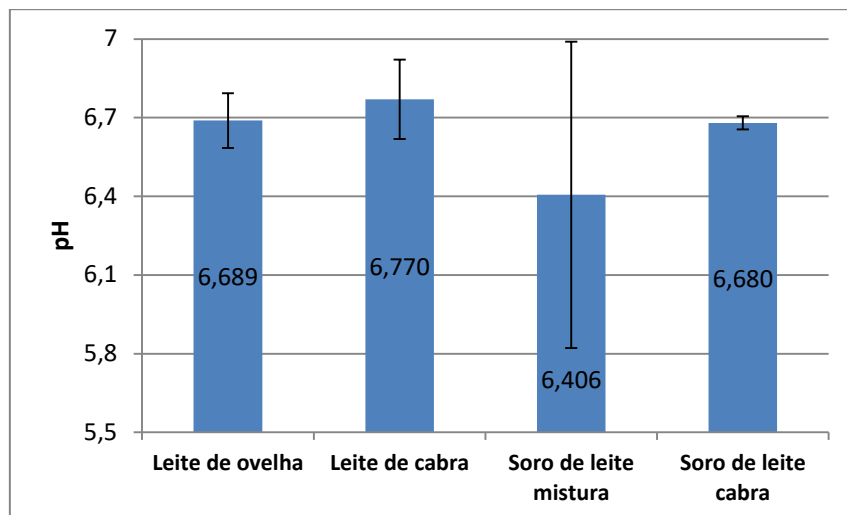


Figura 20 - pH dos produtos leite de ovelha, leite de cabra e soro de leite de mistura (vaca e cabra) e de cabra.

A comparação dos valores médios determinados em laboratório com os valores apresentados na tabela descritiva da composição média de nutrientes básicos do leite estão dentro do que é comum; os valores obtidos para os soros de leites permitem concluir que as amostras analisadas estão dentro dos valores expectáveis para um soro de leite doce.

Como é possível confirmar pela observação da figura apresentada, os valores de pH de todos os produtos analisados são semelhantes com exceção do soro de leite de mistura que apresenta um valor médio de pH relativamente inferior, o que se deve a uma única amostra com um pH claramente inferior às restantes, o que tem influência dado o número reduzido de amostras deste tipo, o que também justifica o elevado desvio padrão assinalado.

5.1.2 Concentração de tiocianato

O último parâmetro analisado com a finalidade de caracterização dos produtos em análise, e este com elevada importância para o eficiente funcionamento do sistema em estudo foi o tiocianato.

A determinação da concentração de tiocianato pode ser dividida em duas fases, uma primeira que prevê a formação da reta de calibração e uma segunda fase que resulta do cruzamento da reta de calibração com os valores de absorvância obtidos.

5.1.2.1 Determinação da concentração de tiocianato

Os valores encontrados para a concentração de tiocianato nos produtos em análise encontram-se organizados no gráfico de barras, da figura 21.

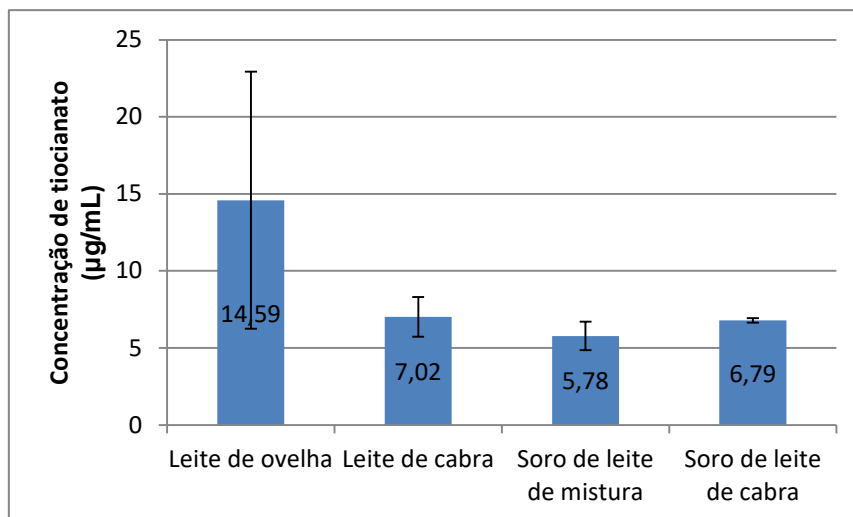


Figura 21 - Concentração de tiocianato nos produtos leites de ovelha, leites de cabra e soro de leites de mistura (vaca e cabra) e de cabra.

O leite de ovelha apresentou um teor médio de tiocianato consideravelmente superior ao obtido para o leite de cabra, respetivamente 14,59 e 7,02 µg/mL. Relativamente aos soro de leite ambos possuem uma concentração média de tiocianato semelhante, 5,78 µg/mL para o soro de leite de mistura e 6,79 µg/mL para o soro de leite de cabra. A informação existente relativamente a este tema ainda é escassa e dispersa, sendo a pesquisa pouco conclusiva quanto à concentração padrão de tiocianato nos produtos, com especial foco no soro de leite e nas espécies apresentadas, pelo que se torna complicado afirmar a regularidade dos resultados obtidos com os teóricos.

Quanto à dispersão dos valores obtidos, nota-se que a análise ao leite de ovelha resultou numa maior panóplia de resultados, podendo estar associado à proveniência diferente das amostras analisadas, associada a factores como a alimentação, que tem elevada influência no teor de tiocianato, como foi referido na introdução.

Este conjunto de valores aponta também para a necessidade de suplementar os produtos com tiocianato, como é aconselhado pela FAO para o leite de vaca, uma vez que como é referido por Whitaker (2003), para o sistema lactoperoxidase/tiocianato ser eficiente torna-se necessária uma concentração de tiocianato no leite de 10-25 ppm.

5.2 Avaliação da ativação do sistema lactoperoxidase/tiocianato na conservação do leite e do soro de leite

5.2.1 Componente microbiana, pH e acidez titulável

De seguida, apresentam-se os resultados dos ensaios de conservação, organizados pelo produto, com base na análise de variância é apresentado o teste de significância e as médias e consequentemente o teste de Fisher aplicado a cada variável dependente para cada método de conservação e tempo.

5.2.1.1 Leite de ovelha

A análise da tabela associada aos resultados da análise de variância relativa aos ensaios de conservação efetuados com leite de ovelha (Tabela 5) aponta para um efeito significativo genérico dos fatores em estudo e sua interação. As exceções são as diferenças não significativas ao nível da influência do método de conservação na contagem de microrganismos mesófilos e a interação dos dois fatores no caso das variáveis contagem de *Enterobacteriaceae* e de mesófilos.

Tabela 5 - Teste de significância de cada variável dependente para o leite de ovelha.

	<i>Enterobacteriaceae</i>	Mesófilos	Psicrotróficos	Acidez	pH
Método de conservação	x	ns	xx	xx	xx
Tempo	xx	xx	xx	xx	xx
Interação	ns	ns	x	xx	xx

xx – $p < 0,01$; x – $p < 0,05$; ns – não significativo

A tabela 6 confirma e esclarece a que fatores se devem as diferenças significativas reportadas na tabela resumo da análise de variância. Assim, verifica-se que a diferença significativa ($p < 0,05$) na variável *Enterobacteriaceae* relativamente ao método de conservação está associado a variação existente entre o controlo a 6°C e os restantes métodos de conservação, ao fim do dia 1 de conservação.

Sob o ponto de vista da conservação do leite, verifica-se que de todas as metodologias testadas apenas a refrigeração conservou a contagem de mesófilos ao longo do tempo de ensaio. Para todas as outras modalidades de ensaio, os resultados da contagem de mesófilos aumentaram de forma significativa ao longo do tempo, com diferenças significativas do início do ensaio para o último dia de conservação. A contagem de *Enterobacteriaceae* apresentou diferenças significativas logo no primeiro dia face ao nível inicial, mesmo para a conservação a 6°C; com esta modalidade de conservação foi possível manter a carga de psicrotróficos sem evolução significativa ao fim de um dia, com evolução a ser notada como significativa ao fim de dois dias

Tabela 6 - Evolução dos parâmetros microbiológicos analisados (*Enterobacteriaceae*, mesófilos e psicrotróficos) do leite de ovelha, ao longo do tempo, para cada método de conservação.

	Controlo T = 6°C	Controlo T = 15°C	Aditivos T = 15°C	Aditivos x2 T = 15°C
<i>Enterobacteriaceae</i> (log ufc/mL)				
0 dias	5,240 ^{ba}	5,240 ^{ba}	5,240 ^{ba}	5,240 ^{ba}
1 dia	6,613 ^{ab}	7,926 ^{aA}	8,378 ^{aA}	7,797 ^{aA}
2 dias	6,982 ^{aA}	7,743 ^{aA}	7,950 ^{aA}	7,826 ^{aA}
Mesófilos (log ufc/mL)				
0 dias	7,168 ^{aA}	7,168 ^{ba}	7,168 ^{ba}	7,168 ^{ba}

1 dia	8,012 ^{aA}	9,605 ^{aA}	9,695 ^{aA}	9,577 ^{aA}
2 dias	8,315 ^{aA}	9,696 ^{aA}	9,284 ^{aA}	9,999 ^{aA}
Psicrotróficos (log ufc/mL)				
0 dias	6,785 ^{aA}	6,785 ^{bA}	6,785 ^{bA}	6,785 ^{bA}
1 dia	7,354 ^{aB}	12,000 ^{aA}	12,000 ^{aA}	12,000 ^{aA}
2 dias	9,813 ^{bB}	12,000 ^{aA}	12,000 ^{aA}	12,000 ^{aA}

* Na mesma coluna, na mesma cor, letras minúsculas diferentes referem-se a diferenças significativas ($p < 0,05$).

** Na mesma linha, na mesma cor, letras maiúsculas diferentes referem-se a diferenças significativas ($p < 0,05$).

As tendências relatadas podem ser observadas na forma de gráficos nas figuras 22, 23 e 24. Embora não se notem diferenças significativas, a observação da figura 23, demonstra que a evolução entre as amostras conservadas a 15°C e a conservada a 6°C, apresentam uma evolução distinta, com menor nível de contagem de mesófilos nesta última. Quanto às diferenças significativas determinadas pelo teste de Fisher para a variável psicrotróficos, esta deve-se às diferenças observadas entre método de conservação a 6°C e as restantes (figura 24).

Em praticamente todos os grupos microbianos, nos diferentes métodos de conservação, assiste-se a variações significativas ao longo do tempo, entre o dia 0 e os posteriores, não se notando diferenças consideráveis entre estes, embora se verifique evolução nos diferentes métodos de conservação (figuras 22, 23 e 24). A evolução microbiana no método de conservação controlo a 6°C evidencia a influência da refrigeração sob o desenvolvimento microbiano, ou seja, nestas amostras verifica-se a inibição do desenvolvimento microbiano de mesófilos, inclusive até ao dia 2, no caso dos psicrotróficos, caracterizados pelo desenvolvimento sensível a temperatura baixa, nota-se uma variação que merece atenção apenas ao dia 2.

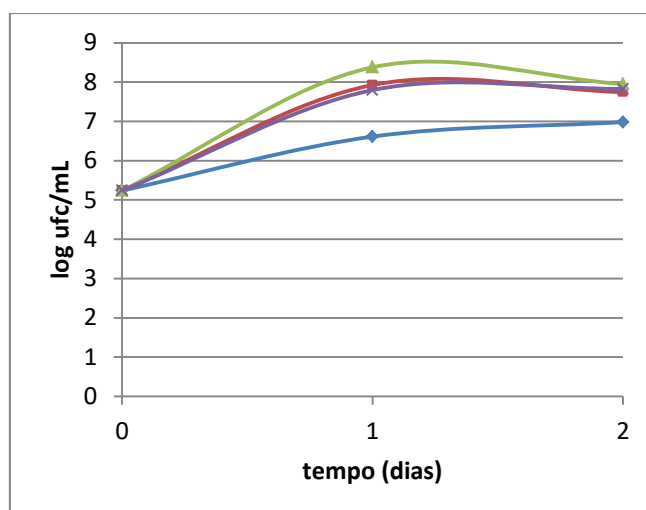


Figura 22 - Evolução dos microrganismos *Enterobacteriaceae* do leite de ovelha, ao longo do tempo, para cada método de conservação.

Legenda: Controlo T = 6°C —▲—; Controlo T = 15°C —■—; Aditivos T = 15°C —▲—; Aditivos x2 T = 15°C —■—.

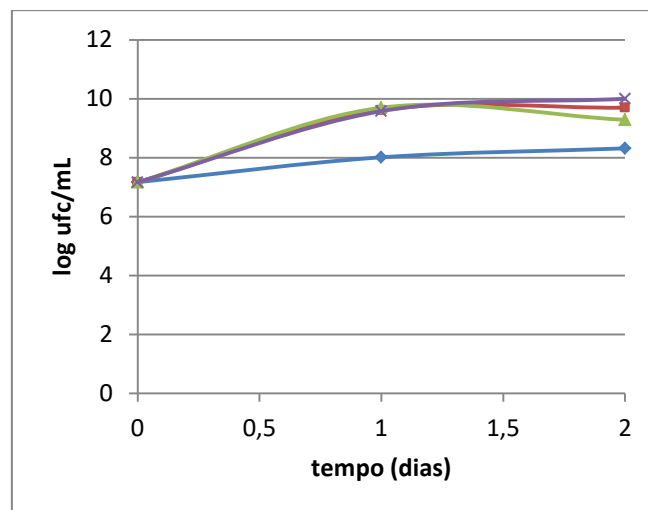


Figura 23 - Evolução dos microrganismos mesófilos do leite de ovelha, ao longo do tempo, para cada método de conservação.

Legenda: Controlo T = 6°C —♦—; Controlo T = 15°C —■—; Aditivos T = 15°C —▲—; Aditivos x2 T = 15°C —✕—.

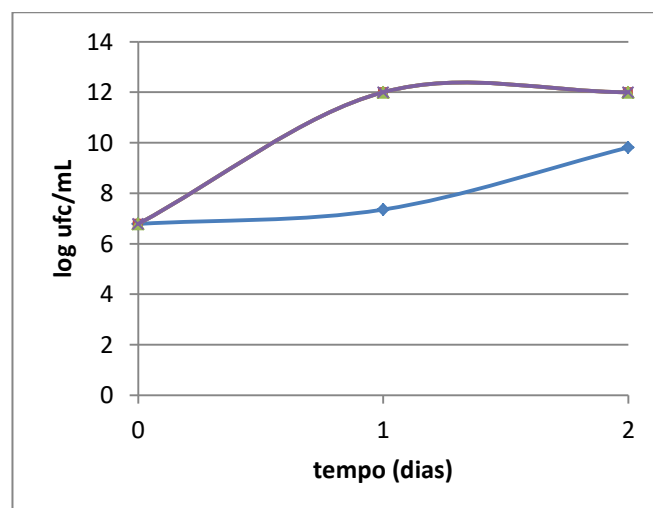


Figura 24 - Evolução dos microrganismos psicrótrópicos do leite de ovelha, ao longo do tempo, para cada método de conservação

Legenda: Controlo T = 6°C —♦—; Controlo T = 15°C —■—; Aditivos T = 15°C —▲—; Aditivos x2 T = 15°C —✕—.

O desenvolvimento microbiano em leite expressa-se normalmente na evolução da acidez e do pH. As tabelas 7 e 8 mostram os resultados obtidos para estes parâmetros ao longo do tempo de conservação segundo as metodologias utilizadas, melhor ilustradas pela figura 25.

A principal conclusão, que corrobora as indicações dadas pelos resultados da avaliação microbiana, é que apenas a refrigeração permitiu controlar a atividade microbiana de acidificação. Para todas as outras modalidades de conservação o leite apresentou níveis de acidez e de pH significativamente diferentes do início dos ensaios e dos resultados da conservação a 6°C ao fim de períodos idênticos.

Tabela 7 - Evolução do pH do leite de ovelha, ao longo do tempo, para cada método de conservação.

	Controlo T = 6°C	Controlo T = 15°C	Aditivos T = 15°C	Aditivos x2 T = 15°C
pH				
0 dias	6,542 ^{aA}	6,542 ^{aA}	6,542 ^{aA}	6,542 ^{aA}
1 dias	6,450 ^{aB}	5,296 ^{bA}	5,364 ^{bA}	5,346 ^{bA}
2 dias	6,258 ^{bB}	4,877 ^{cA}	4,908 ^{cA}	4,864 ^{cA}

* Na mesma coluna, na mesma cor, letras minúsculas diferentes referem-se a diferenças significativas (p<0,05).

** Na mesma linha, na mesma cor, letras maiúsculas diferentes referem-se a diferenças significativas (p<0,05).

Tabela 8 - Evolução da acidez titulável do leite de ovelha, ao longo do tempo, para cada método de conservação.

	Controlo T = 6°C	Controlo T = 15°C	Aditivos T = 15°C	Aditivos x2 T = 15°C
Acidez titulável (mL NaOH N/L)				
0 dias	24,500 ^{aA}	24,500 ^{aA}	24,500 ^{aA}	24,500 ^{aA}
1 dias	27,000 ^{aB}	83,125 ^{bA}	77,375 ^{bA}	82,000 ^{bA}
2 dias	30,875 ^{aB}	116,626 ^{cA}	120,750 ^{cA}	113,750 ^{cA}

* Na mesma coluna, na mesma cor, letras minúsculas diferentes referem-se a diferenças significativas (p<0,05).

** Na mesma linha, na mesma cor, letras maiúsculas diferentes referem-se a diferenças significativas (p<0,05).

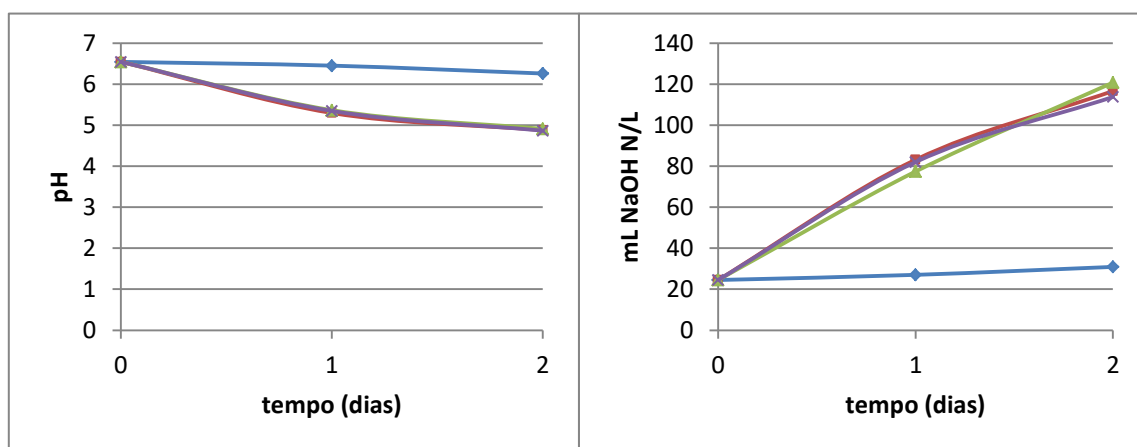


Figura 25 - Evolução do pH e da acidez titulável do leite de ovelha, ao longo do tempo, para cada método de conservação.

Legenda: Controlo T = 6°C —◆—; Controlo T = 15°C —■—; Aditivos T = 15°C —▲—; Aditivos x2 T = 15°C —×—.

Em qualquer das modalidades de conservação a 15°C, a acidez atinge valores muito acima do que se verifica para o leite sob refrigeração e não se verificam diferenças entre o ensaio controlo a 15°C e os ensaios com ativação do sistema lactoperoxidase/tiocianato. O comportamento do pH acompanha estas variações, atingindo-se níveis muito baixos logo ao fim de 1 dia de conservação. Não se nota o mesmo grau de evolução no crescimento dos microrganismos, o que poderá estar

associado ao tipo de microrganismos desenvolvidos e à quantidade de ácido por eles produzido. A quantidade de ácido produzido pelos microrganismos é muito elevada, e desde muito cedo o poder tampão do leite não é suficiente para acomodar a ação do ácido.

O sistema lactoperoxidase/tiocianato parece, assim não ter sido eficiente na conservação do leite de ovelha a 15°C, ao contrário do esperado. Deve notar-se no entanto que o nível microbiano inicial do leite, expresso pela contagem de microrganismos a 30°C, era muito elevado (log 7,168, superior a 10^7 ufc/mL) suplantando em 1 ciclo logarítmico o máximo admitido para o leite cru de ovelha pelo Reg. CE 853/2004 (10^6 ufc/mL). Segundo Wolfson e Summer (1993) e a WHO/FAO (2005), o sistema mostra efeito bactericida para contaminações reduzidas (10^2 ufc/mL) e efeito bacteriostático a um nível de microrganismos superior ($10^6 - 10^7$ ufc/mL).

5.2.1.2 Leite de cabra

Uma análise ao quadro resumo da análise de variância efetuada sobre os resultados obtidos nos ensaios de conservação com leite de cabra (tabela 9) permite verificar que a evolução da generalidade dos grupos microbianos avaliados, bem como do reflexo do seu desenvolvimento (acidez e pH), foi afetada quer pelo método de conservação, quer pelo tempo, quer ainda pela interação dos dois fatores. Apenas no caso das variáveis *Enterobacteriaceae* e pH não se verificou influências significativas associadas à interação dos fatores em estudo.

Tabela 9 - Teste de significância de cada variável dependente para o leite de cabra.

	<i>Enterobacteriaceae</i>	Mesófilos	Psicrófilos	Acidez	pH
Método de conservação	xx	xx	xx	xx	ns
Tempo	xx	xx	xx	xx	xx
Interação	ns	x	x	xx	ns

xx – $p < 0,01$; x – $p < 0,05$; ns – não significativo

Os microrganismos mesófilos desenvolveram-se gradualmente e de forma significativa ao longo do tempo, para todos os ensaios realizados, como se pode observar na tabela 10 e também na figura 27. Apesar da refrigeração se ter mostrado como o processo de conservação mais eficaz, ao fim de 2 dias de conservação a contagem deste grupo microbiano atingiu níveis mais elevados do que o limite sugerido pela regulamentação em vigor. Embora as diferenças não sejam significativas, o processo de conservação utilizando o dobro dos aditivos sugeridos pela WHO/FAO revelou níveis microbianos ligeiramente inferiores ao controlo a 15 °C e à metodologia proposta pela FAO, efeito mais visível no grupo dos psicotróficos e na contagem de *Enterobacteriaceae*.

Tabela 10 - Evolução dos parâmetros microbiológicos analisados (*Enterobacteriaceae*, mesófilos e psicrotróficos) do leite de cabra, ao longo do tempo, para cada método de conservação.

	Controlo T = 6 °C	Controlo T = 15 °C	Aditivos T = 15 °C	Aditivos x2 T = 15 °C
<i>Enterobacteriaceae</i> (log ufc/mL)				
0 dias	2,984 ^{aA}	2,984 ^{bA}	2,984 ^{bA}	2,984 ^{bA}
1 dia	3,254 ^{aB}	6,123 ^{aA}	6,024 ^{aA}	5,880 ^{aA}
2 dias	3,592 ^{aB}	6,972 ^{aA}	6,877 ^{aA}	6,783 ^{aA}
Mesófilos (log ufc/mL)				
0 dias	5,374 ^{aA}	5,374 ^{aA}	5,374 ^{aA}	5,374 ^{aA}
1 dia	6,227 ^{bB}	7,902 ^{bA}	7,732 ^{bA}	7,650 ^{bA}
2 dias	7,515 ^{cB}	8,931 ^{cA}	8,977 ^{cA}	8,803 ^{cA}
Psicrotróficos (log ufc/mL)				
0 dias	5,190 ^{aA}	5,190 ^{aA}	5,190 ^{aA}	5,190 ^{aA}
1 dia	6,195 ^{bB}	7,560 ^{bA}	7,458 ^{bA}	7,422 ^{aA}
2 dias	7,251 ^{cB}	8,299 ^{cA}	8,273 ^{cA}	7,843 ^{aA}

* Na mesma coluna, na mesma cor, letras minúsculas diferentes referem-se a diferenças significativas (p<0,05).

** Na mesma linha, na mesma cor, letras maiúsculas diferentes referem-se a diferenças significativas (p<0,05).

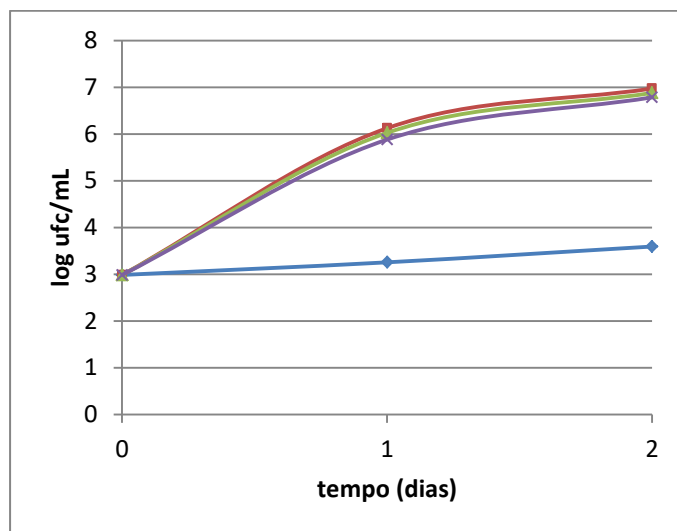


Figura 26 - Evolução dos microrganismos *Enterobacteriaceae* do leite de cabra, ao longo do tempo, nos diferentes métodos de conservação.

Legenda: Controlo T = 6°C —▲—; Controlo T = 15°C —■—; Aditivos T = 15°C —▲—; Aditivos x2 T = 15°C —▲—.

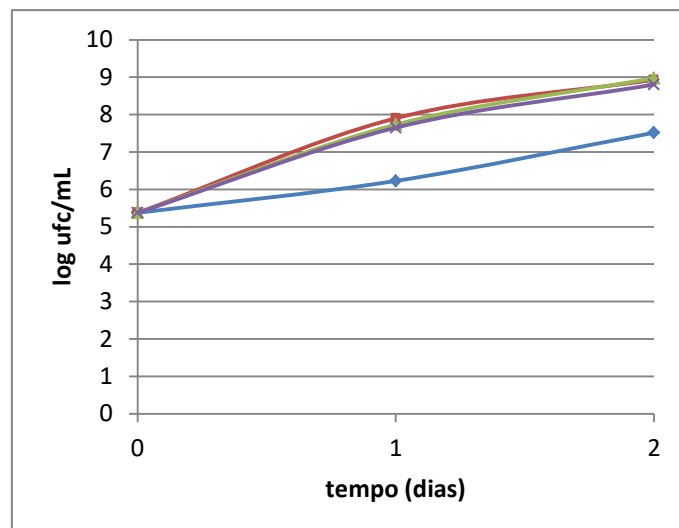


Figura 27 - Evolução dos microrganismos mesófilos do leite de cabra, ao longo do tempo, nos diferentes métodos de conservação.

Legenda: Controlo T = 6°C —♦—; Controlo T = 15°C —■—; Aditivos T = 15°C —▲—; Aditivos x2 T = 15°C —×—.

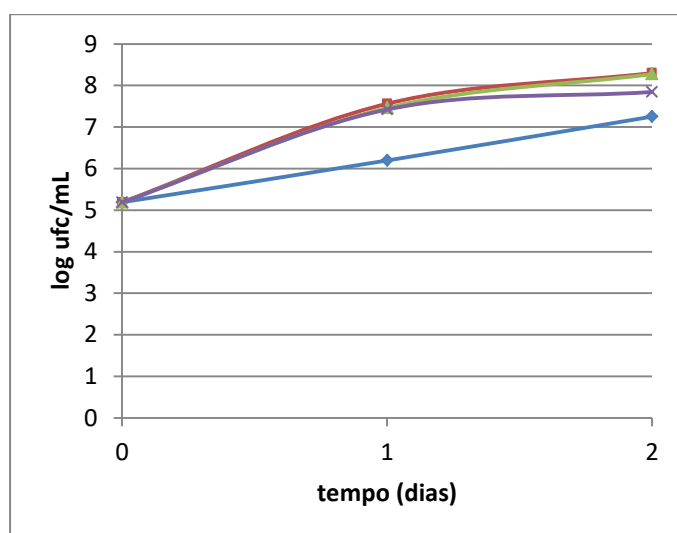


Figura 28 - Evolução dos microrganismos psicrótrófos do leite de cabra, ao longo do tempo, nos diferentes métodos de conservação.

Legenda: Controlo T = 6°C —♦—; Controlo T = 15°C —■—; Aditivos T = 15°C —▲—; Aditivos x2 T = 15°C —×—.

Relativamente à evolução da componente microbiana avaliada, nota-se um aumento significativo de contagens ao longo do período abordado, com exceção da variável *Enterobacteriaceae* e psicrótrófos, no caso do método de conservação aditivos x2, para o qual evoluem no mesmo sentido, tal como se pode verificar pelas figuras 26 e 28, embora de forma não significativa, o que pode estar associado a um maior desvio padrão das respetivas médias.

A observação conjunta das tabelas 11 e 12 e da figura 29 permitem avaliar a evolução da acidez titulável e do pH e determinar onde se encontram as diferenças significativas verificadas na tabela 9. Nota-se que as diferenças consideradas na acidez, quanto aos métodos de conservação, se verificam ao fim do dia 2, entre a amostra controlo a 6°C e as restantes amostras, sem variação nos restantes métodos de conservação.

Também no caso da acidez se verifica que a refrigeração foi o sistema de conservação mais eficiente e que o sistema lactoperoxidase/tiocianato não teve efeito de conservação pelo menos a partir do primeiro dia. Nota-se ainda, que parece existir algum efeito da metodologia aditivos x2, embora de forma não significativa.

Tabela 11 - Evolução do pH do leite de cabra, ao longo do tempo, para cada método de conservação.

	Controlo T = 6 °C	Controlo T = 15 °C	Aditivos T = 15 °C	Aditivos x2 T = 15 °C
pH				
0 dias	6,744 ^{aA}	6,744 ^{bA}	6,744 ^{bA}	6,744 ^{bA}
1 dias	6,739 ^{aA}	6,298 ^{abA}	6,285 ^{abA}	6,276 ^{abA}
2 dias	6,683 ^{aB}	5,354 ^{aA}	5,335 ^{aA}	5,077 ^{aA}

* Na mesma coluna, na mesma cor, letras minúsculas diferentes referem-se a diferenças significativas ($p < 0,05$).

** Na mesma linha, na mesma cor, letras maiúsculas diferentes referem-se a diferenças significativas ($p < 0,05$).

Tabela 12 - Evolução da acidez titulável do leite de cabra ao longo do tempo, para cada método de conservação.

	Controlo T = 6 °C	Controlo T = 15 °C	Aditivos T = 15 °C	Aditivos x2 T = 15 °C
Acidez (mL NaOH N/L)				
0 dias	13,500 ^{aA}	13,500 ^{aA}	13,500 ^{aA}	13,500 ^{aA}
1 dias	13,500 ^{aA}	23,000 ^{aA}	23,000 ^{aA}	24,000 ^{aA}
2 dias	18,000 ^{aB}	90,000 ^{bA}	92,500 ^{bA}	83,500 ^{bA}

* Na mesma coluna, na mesma cor, letras minúsculas diferentes referem-se a diferenças significativas ($p < 0,05$).

** Na mesma linha, na mesma cor, letras maiúsculas diferentes referem-se a diferenças significativas ($p < 0,05$).

Relativamente à evolução da acidez ao longo do tempo é, assim, de apontar variação relevante entre os dias 0 e 1 e o último dia, apenas nas amostras a 15°C, o que revela a eficiência sob os microrganismos e consequente produção de ácido por parte da conservação a 6°C. A

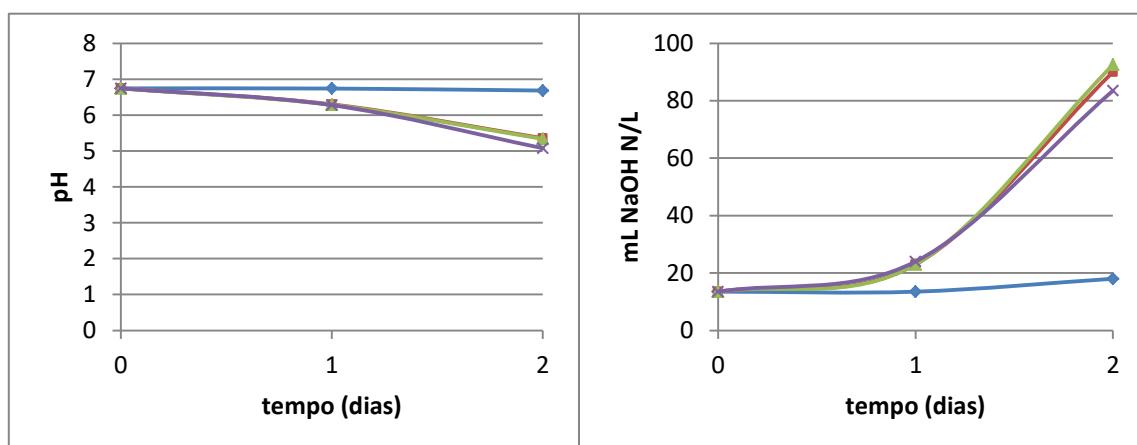


Figura 29 - Evolução do pH e da acidez titulável do leite de cabra, ao longo do tempo, dos diferentes métodos de conservação. 46

Legenda: Controlo T = 6°C —◆—; Controlo T = 15°C —■—; Aditivos T = 15°C —▲—; Aditivos x2 T = 15°C —×—.

evolução do pH esteve em concordância com a evolução da acidez, a 6°C não se verificando evolução significativa do pH, enquanto a 15°C a evolução é progressiva, sendo significativas as diferenças encontradas entre o dia 0 e o dia 2.

Assim, também para o leite de cabra, o sistema lactoperoxidase/tiocianato parece não ter sido eficiente na conservação a 15°C, ao contrário do esperado. Neste caso, o nível microbiano inicial do leite expresso pela contagem de microrganismos a 30°C, embora elevado, situa-se entre 10^5 ufc/mL e 10^6 ufc/mL, não atingia os níveis verificados no caso dos ensaios com leite de ovelha.

5.2.1.3 Soro de leite

A análise dos resultados obtidos nos ensaios efetuados com soro de leite, permitiu notar que os fatores método de conservação e o tempo não tiveram efeito significativo para nenhuma das variáveis em estudo, tal como verificado para a interação entre ambos, não obstante as variações que se verificam nas médias das contagens para os diferentes grupos microbianos (log ufc/mL) ou para a acidez e o pH obtidas, quer em função do tempo, quer em função da modalidade de ensaio, como se pode observar nas figuras 30 a 33.

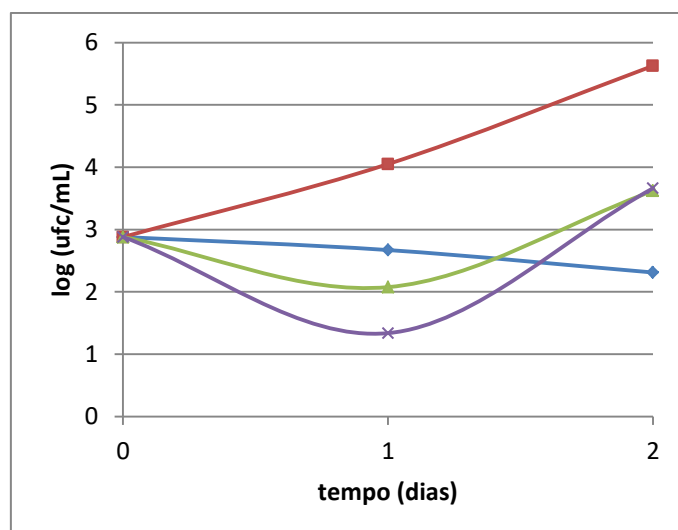


Figura 30 - Evolução dos microrganismos *Enterobacteriaceae* do soro de leite ao longo do tempo, dos diferentes métodos de conservação.

Legenda: Controlo T = 6°C —◆—; Controlo T = 15°C —■—; Aditivos T = 15°C —▲—; Aditivos x2 T = 15°C —×—.

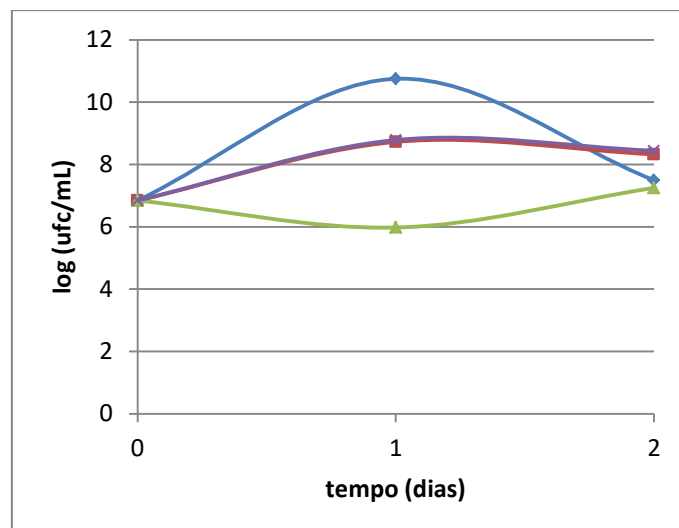


Figura 31 - Evolução dos microrganismos mesófilos do soro de leite ao longo do tempo, dos diferentes métodos de conservação.

Legenda: Controlo T = 6°C —♦—; Controlo T = 15°C —■—; Aditivos T = 15°C —▲—; Aditivos x2 T = 15°C —×—.

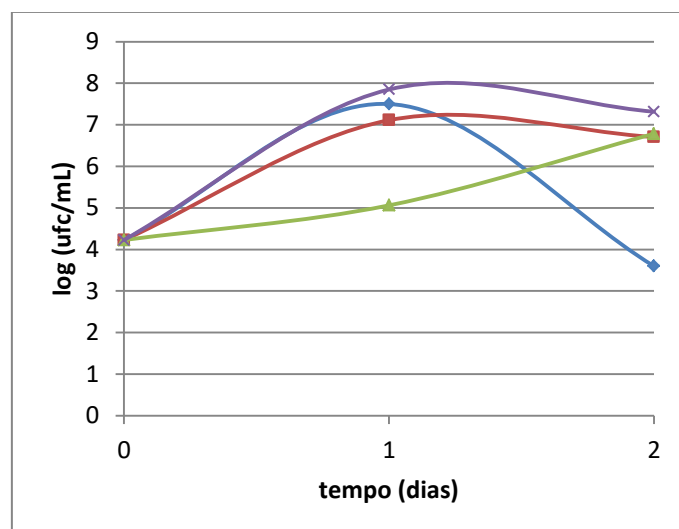


Figura 32 - Evolução dos microrganismos psicrotróficos do soro de leite ao longo do tempo, dos diferentes métodos de conservação.

Legenda: Controlo T = 6°C —♦—; Controlo T = 15°C —■—; Aditivos T = 15°C —▲—; Aditivos x2 T = 15°C —×—.

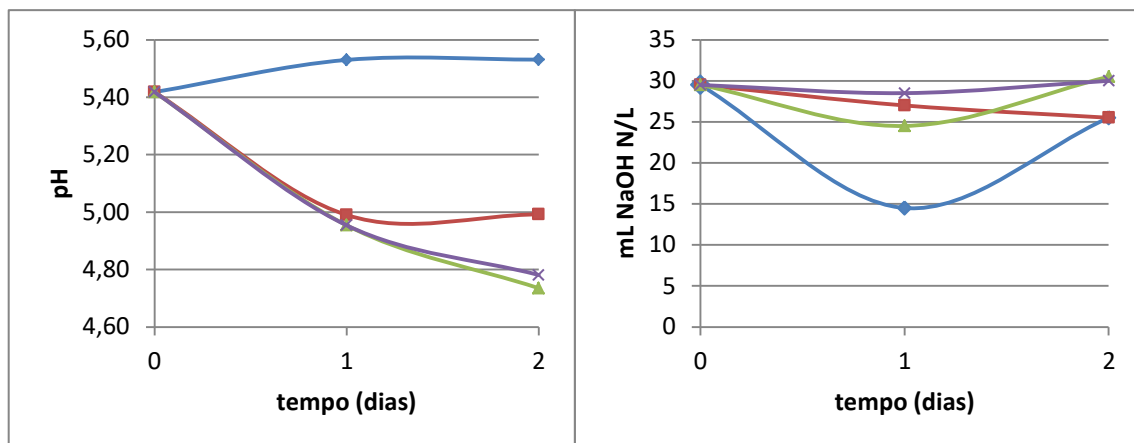


Figura 33 - Evolução do pH e da acidez titulável do soro de leite, ao longo do tempo, dos diferentes métodos de conservação.

Legenda: Controlo T = 6°C —♦—; Controlo T = 15°C —■—; Aditivos T = 15°C —▲—; Aditivos x2 T = 15°C —✕—.

Na verdade, os dois ensaios com soro de leite partiram de produtos com características diferentes, quer a nível microbiano, quer a nível de acidez e pH. Nestas condições, uma vez que o diferente perfil e consequente desenvolvimento microbiano dos produtos resultaram em amplos desvios padrões, o que se traduziu na ausência de diferenças significativas segundo o teste de Fisher, optou-se pela análise em separado dos dois ensaios realizados.

5.2.1.3.1 Ensaio 1

As figuras 34, 35 e 36 representam a evolução dos grupos microbianos *Enterobacteriaceae*, mesófilos e psicrótrófos, respetivamente. A análise da evolução dos microrganismos permite referir que o sistema lactoperoxidase/tiocianato poderá ter provocado algum efeito relativamente a todos os grupos microbianos com a utilização da proporção de reagente indicada pelo guia *Codex Alimentarius – Guidelines for the preservation of raw milk by use the lactoperoxidase system*; a adição do dobro de percarbonato de sódio e tiocianato de sódio apresentou também efeito sobre o grupo *Enterobacteriaceae* (figura 34). Para comparação, a tendência de desenvolvimento do grupo *Enterobacteriaceae* nos controlos a 6°C e a 15°C foi de contagens decrescentes, sem diferenças representativas entre ambos.

Gupta *et al.*, (1986) referenciaram que a resposta dada pelos microrganismos ao sistema lactoperoxidase/tiocianato, de entre outros fatores, depende de quais os microrganismos presentes no leite, o que, conjugado com a temperatura de desenvolvimento ótima de cada grupo microbiano é um ponto de partida para justificar os perfis distintos.

As contagens de microrganismos mesófilos revelaram-se semelhantes para o controlo a 6°C, controlo a 15°C e para os métodos de conservação aditivos a 15°C, apresentando estas uma tendência decrescente acentuada entre o início e o dia 1 (figura 35).

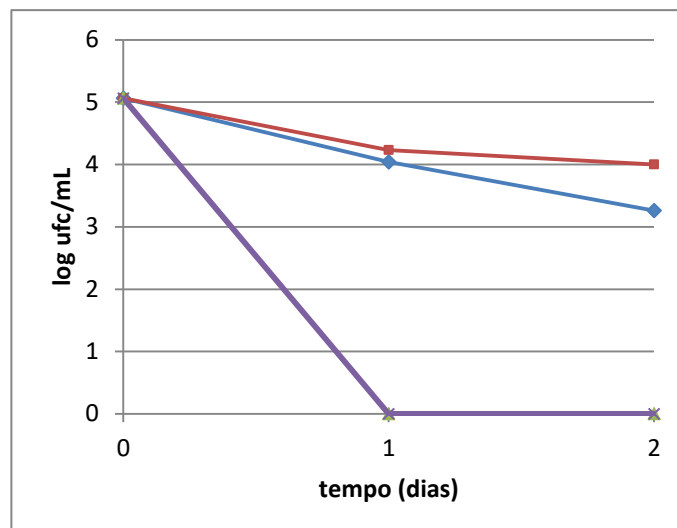


Figura 34 -Evolução dos microrganismos *Enterobacteriaceae* do soro de leite de mistura ao longo do tempo, para cada método de conservação (ensaio 1).

Legenda: Controle T = 6°C —♦—; Controle T = 15°C —■—; Aditivos T = 15°C —▲—; Aditivos x2 T = 15°C —x—.

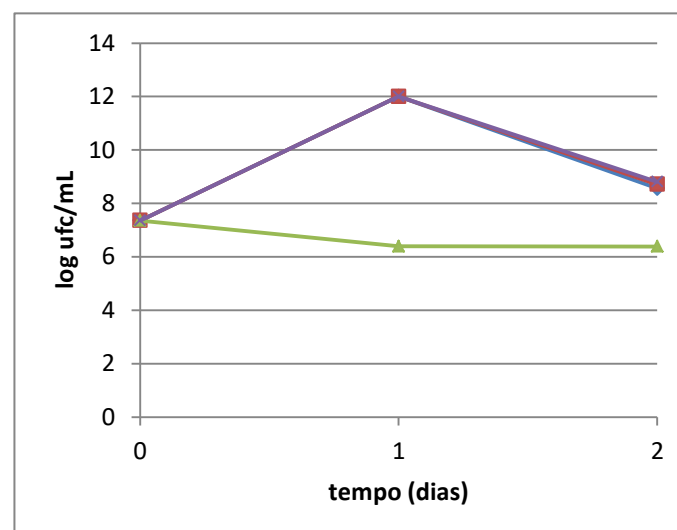


Figura 35 - Evolução dos microrganismos mesófilos do soro de leite de mistura ao longo do tempo, para cada método de conservação (ensaio 1).

Legenda: Controle T = 6°C —♦—; Controle T = 15°C —■—; Aditivos T = 15°C —▲—; Aditivos x2 T = 15°C —x—.

Os microrganismos psicrótrópicos apresentam uma tendência crescente entre o dia 0 e 1, decrescendo seguidamente as contagens entre o dia 1 e 2, com exceção do método de conservação aditivos a 15°C, o qual apresentou um pequeno decréscimo do dia 0 ao 1, mantendo-se aproximadamente constante até ao final do ensaio (figura 36). Neste grupo microbiano, tal como era previsível, o desenvolvimento nas amostras a 6°C é superior, o que reforça o eventual benefício da utilização do processo de refrigeração juntamente com a ativação do sistema lactoperoxidase/tiocianato, tal como afirmam Pokhrel e Das (2014).

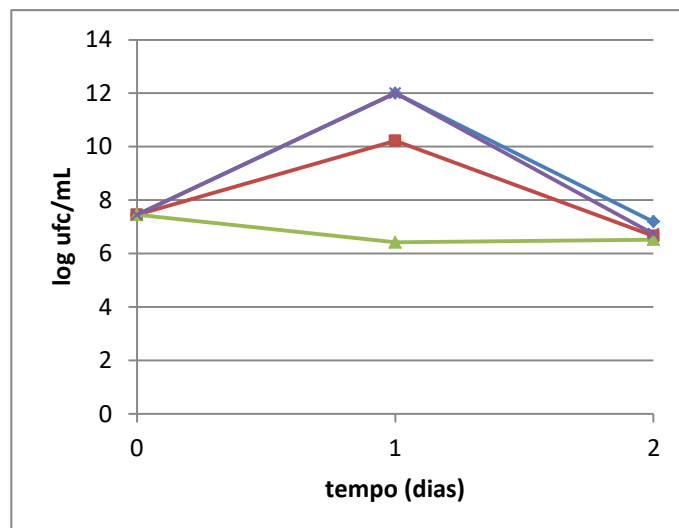


Figura 36 - Evolução dos microrganismos psicrotróficos do soro de leite de mistura ao longo do tempo, para cada método de conservação (ensaio 1).

Legenda: Controlo T = 6°C —●—; Controlo T = 15°C —■—; Aditivos T = 15°C —▲—; Aditivos x2 T = 15°C —×—.

Deve notar-se que, neste ensaio, as contagens microbianas iniciais atingiam níveis muito elevados, para todos os grupos microbianos, naturais em soro de leite proveniente do fabrico de queijo, mas, neste ensaio, com impacto evidente nas características de acidez e pH iniciais do soro de leite. De facto, na figura 37, observa-se que no início do ensaio o pH era de cerca de 4,50 e a acidez situava-se acima de 45 mL NaOH N/L.

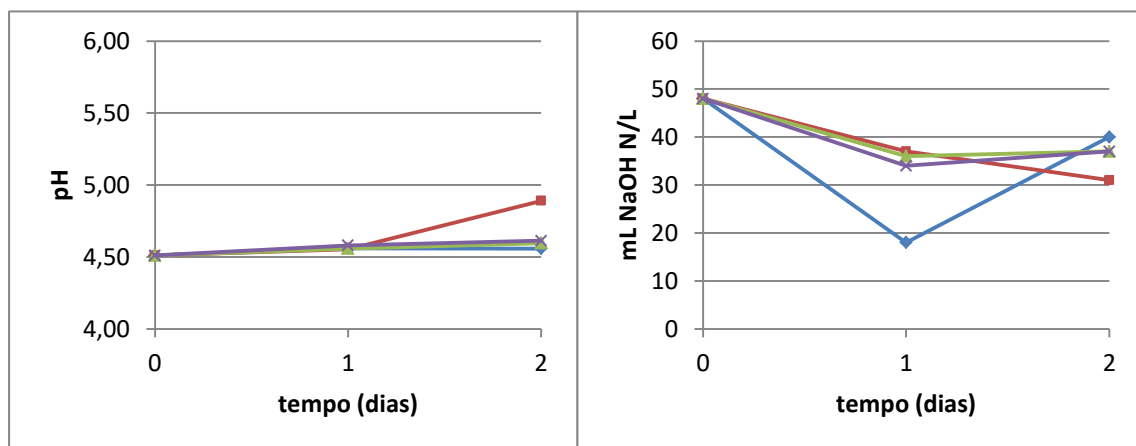


Figura 37 - Evolução do pH e da acidez do soro de leite de mistura ao longo do tempo, para cada método de conservação (ensaio 1).

Legenda: Controlo T = 6°C —●—; Controlo T = 15°C —■—; Aditivos T = 15°C —▲—; Aditivos x2 T = 15°C —×—.

A análise da figura permite verificar que estes parâmetros se mantiveram relativamente constantes ao longo de todo o ensaio, com exceção da amostra refrigerada que ao dia 1 apresenta uma acidez muito reduzida, que mesmo assim não tem influência sobre o pH, o que indica um provável erro experimental. Relativamente ao comportamento destes parâmetros em comparação à evolução dos microrganismos estudados, era esperado um delineamento das retas inverso até ao dia

1, o que demonstra que os microrganismo que se desenvolveram não serão, provavelmente, grandes produtores de ácido nas condições do ensaio.

5.2.1.3.2 Ensaio 2

O soro de leite disponível para o segundo ensaio revelou algumas diferenças relativamente ao utilizado no ensaio anterior. Como se pode observar nas figuras 38, 39 e 40, para contagens de microrganismos mesófilos um pouco inferiores, os grupos de *Enterobacteriaceae* e de psicrotróficos revelaram presenças muito inferiores, com valores não superiores a 100 ufc/mL.

A análise das figuras 38, 39 e 40, relativas à evolução microbiana de *Enterobacteriaceae*, de mesófilos e de psicrotróficos, respetivamente, mostra que em todos os grupos se verificou efeito antimicrobiano provocado pela refrigeração, comportando-se os outros métodos de conservação de forma muito semelhante.

A tendência da evolução a 15°C foi nitidamente de evolução microbiana, mais evidente nos grupos *Enterobacteriaceae* e psicrotróficos. Nas *Enterobacteriaceae* nota-se no entanto, uma ligeira menor contagem ao fim do primeiro dia no caso do no método de conservação aditivos x2, relativamente ao controlo a 15°C e ao ensaio aditivos a 15°C.

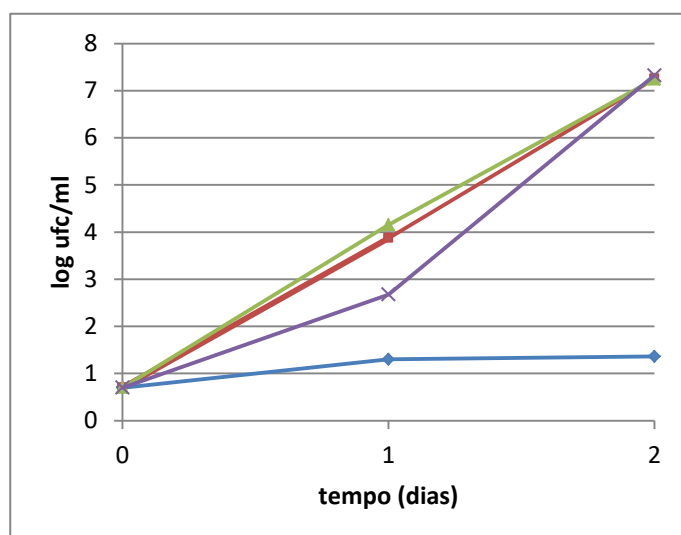


Figura 38 - Evolução dos microrganismos *Enterobacteriaceae* do soro de leite de mistura ao longo do tempo, para cada método de conservação (ensaio 2).

Legenda: Controlo T = 6°C —●—; Controlo T = 15°C —●—; Aditivos T = 15°C —●—; Aditivos x2 T = 15°C —●—.

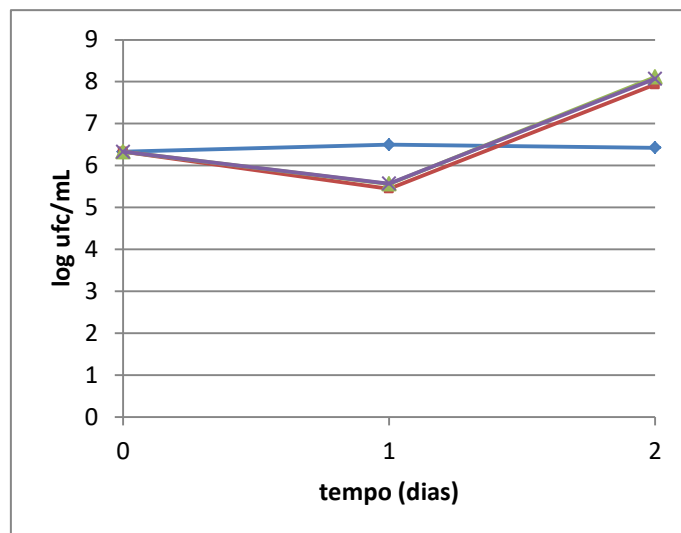


Figura 40 - Evolução dos microrganismos mesófilos do soro de leite de mistura ao longo do tempo, para cada método de conservação (ensaio 2).

Legenda: Controlo T = 6°C —♦—; Controlo T = 15°C —■—; Aditivos T = 15°C —▲—; Aditivos x2 T = 15°C —x—.

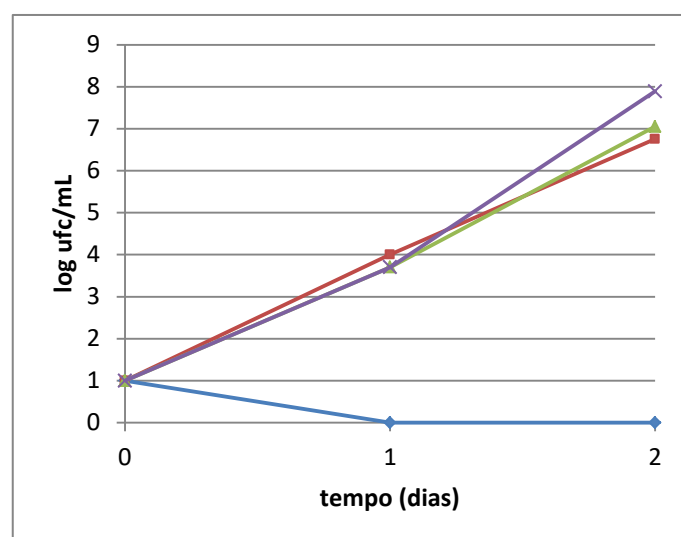


Figura 39- Evolução dos microrganismos psicrotróficos do soro de leite de mistura ao longo do tempo, para cada método de conservação (ensaio 2).

Legenda: Controlo T = 6°C —♦—; Controlo T = 15°C —■—; Aditivos T = 15°C —▲—; Aditivos x2 T = 15°C —x—.

A figura 41 mostra a evolução do pH e da acidez titulável do segundo ensaio do soro de leite, as quais se relacionam bem com o desenvolvimento microbiano observado.

Na verdade, os valores de pH e de acidez desenvolvem-se de acordo com a evolução microbiana; o carácter antimicrobiano da refrigeração reflete-se na evolução praticamente constante dos parâmetros em questão. No caso dos restantes métodos de conservação a 15°C, a evolução do pH aponta para uma redução, mostrando que não se verifica efeito antimicrobiano. No entanto, deve ser considerado que, neste caso, ao fim de 1 dia, o pH não atingiu valores tão baixos como os verificados no início do ensaio 1.

A 6°C, a acidez titulável praticamente não aumentou ao longo do tempo; a evolução da acidez foi ligeiramente distinta nos ensaios controlo, aditivos e aditivos x2 a 15°C, terminando estes com valores semelhantes no final do ensaio. Ao fim de 1 dia, parece que a utilização dos aditivos revelou algum efeito mitigador da atividade microbiana, mas será difícil explicar, nesta circunstância, o comportamento no ensaio aditivos x2. Estas variações, no entanto, não são suficientes para serem notadas ao nível do pH.

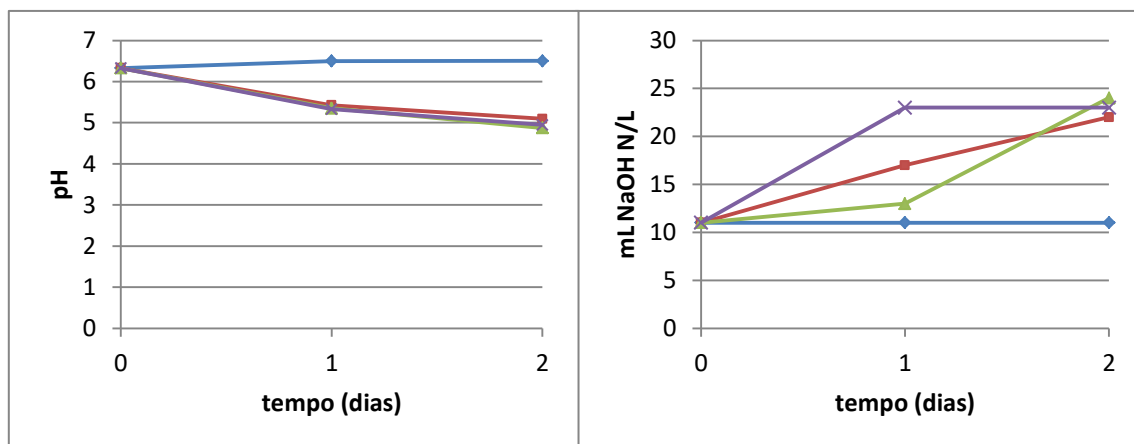


Figura 41 - Evolução do pH e da acidez do soro de leite de mistura ao longo do tempo, para cada método de conservação (ensaio 2).

Legenda: Controlo T = 6°C —◆—; Controlo T = 15°C —■—; Aditivos T = 15°C —▲—; Aditivos x2 T = 15°C —×—.

5.2.1.3.3 Análise global dos ensaios de conservação do soro de leite

No conjunto dos ensaios de conservação de soro de leite, os resultados não foram conclusivos. Em estudo estão dois soros de leites de composições distintas, consequentemente com perfis microbianos distintos, o que leva eventualmente a comportamentos diferentes do sistema lactoperoxidase/tiocianato. Ainda assim, é importante ter em conta, que mesmo sem legislação que delimite o valor máximo aceite de contagem de microrganismos, a carga microbiana de mesófilos inicial dos soros de leites é elevada (ensaio 1 – 10^7 ufc/mL; ensaio 2 – 10^6 ufc/mL), semelhante aos níveis observados nos ensaios de leite de ovelha, embora com níveis de *Enterobacteriaceae* e psicrótrófos substancialmente diferentes. A nível destes grupos parece haver algum efeito do sistema mas, de facto, globalmente os ensaios não foram conclusivos.

5.2.2 Medição do teor de peróxido de hidrogénio

Um dos aspetos essenciais da utilização deste sistema reside no facto de que o efeito sobre os microrganismos não se exerce pelo peróxido de hidrogénio, mas sim, pelos compostos que têm origem na ação da lactoperoxidase sobre o peróxido de hidrogénio e, em consequência, sobre o tiocianato. Assim, o sistema baseia-se em quantidades de peróxido diminuta, ao contrário da utilização deste diretamente como conservante.

Deste modo, torna-se importante a avaliação da presença de peróxido de hidrogénio no leite aquando da adição do percarbonato de sódio ao leite como agente gerador da água oxigenada no leite.

As medições do teor de peróxido de hidrogénio realizadas nos seis ensaios realizados resultaram todas na ausência de peróxido de hidrogénio (0 mg/L H_2O_2), com base na escala das bandas, utilizadas para o efeito.

5.2.3 Ensaios suplementares, com monitorização da acidez em 24/26 horas

Uma vez que os resultados da ativação do sistema não se mostraram eficientes para conservação do leite, não se verificando diferenças significativas entre os métodos de conservação a 15°C, tal como foi possível notar na anterior análise e discussão dos resultados, e uma vez que se verificou quase sempre uma variação substancial nos parâmetros analisados logo às 24 horas, sentiu-se a necessidade de avaliar qual a variação nas primeiras 24 horas de ensaio. Para tal, a opção foi utilizar metodologias laboratoriais simples que permitissem a monitorização das propriedades do leite a um ritmo apertado, tendo sido escolhida a medição da acidez titulável. Foram efetuados quatro ensaios, três com leite de cabra e um com soro de leite de cabra.

5.2.3.1 Leite de cabra

As figuras 42, 43 e 44 representam graficamente os resultados da evolução do pH e da acidez titulável em leite de cabra, em períodos diferentes mas não excedendo o período de 26 horas. As duas primeiras figuras reportam os resultados referentes aos ensaios efetuados nas condições anteriores (controlo 6 °C, controlo 15 °C, aditivos 15 °C e aditivos x2 15 °C), um dos ensaios decorrendo num período de 26 horas (figura 42) e outro em 6 horas (figura 43). A figura 44 corresponde a um ensaio decorreu por 25 horas, a uma temperatura de 30 °C, com três modalidades (controlo, aditivos e aditivos x2), sem a modalidade de refrigeração. Este ensaio foi adicionado ao plano definido inicialmente, no sentido de forçar a alteração do leite, avaliando o efeito da ativação do sistema na conservação do leite a temperaturas mais elevadas.

A observação das figuras permite verificar que até à hora 6/7 não se verificam grandes variações entre os métodos de conservação, independentemente da temperatura a que decorre o ensaio, apresentando o ensaio decorrido a temperatura de 30°C, pH e uma acidez ligeiramente superior aos restantes ensaios.

A determinação após 24 horas demonstra que a 15°C as amostras mantêm-se com uma acidez titulável relativamente semelhante, distinguindo-se do controlo a 6°C (figura 42), que praticamente se manteve constante. Por fim, a medição na vigésima sexta hora demonstra grande evolução na acidez em todas as amostras, com exceção do controlo a 6°C. Para esta, a acidez manteve-se praticamente sem alteração, enquanto as amostras às quais foram adicionadas aditivos apresentando-se com valores aproximados, notando um ligeiro escalonamento de valores mais elevados para o controlo a 15°C e evolução menos acentuada para a modalidade aditivos x2. A acidez parece manter-se pelo menos durante as primeiras 5 a 6 horas após o início do ensaio (figura 43).

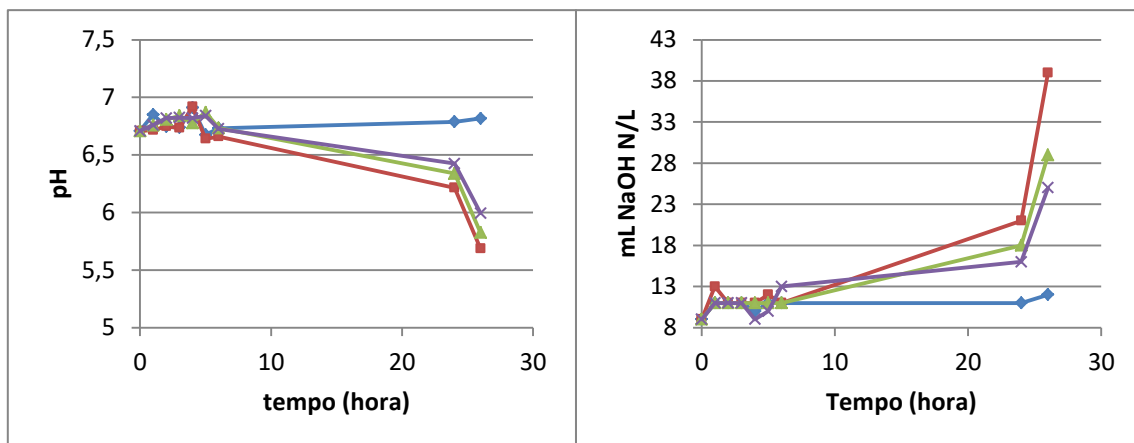


Figura 42 - Evolução do pH e da acidez titulável do leite de cabra ao longo do tempo (0-6, 24 e 26 horas), para cada método de conservação.

Legenda: Controlo T = 6°C —◆—; Controlo T = 15°C —■—; Aditivos T = 15°C —▲—; Aditivos x2 T = 15°C —×—.

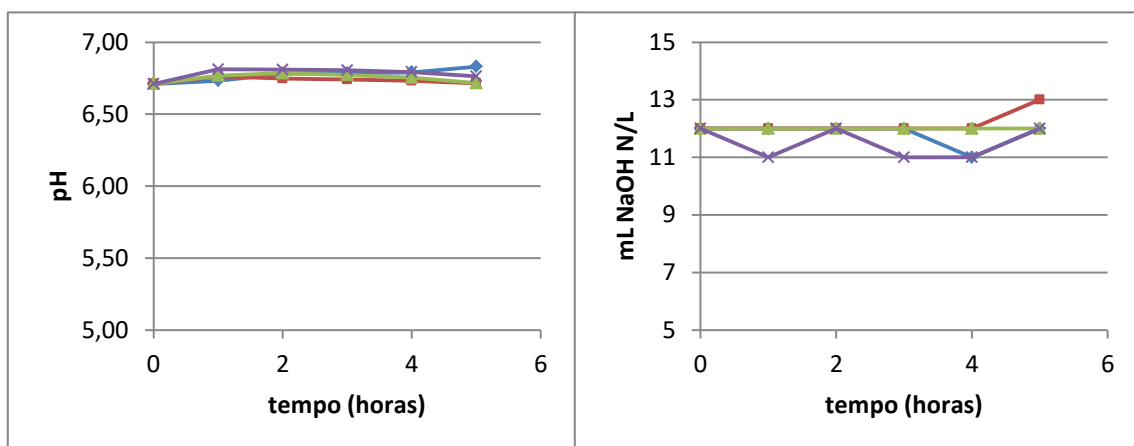


Figura 43 - Evolução do pH e da acidez titulável do leite de cabra ao longo do tempo (0-5 horas), para cada método de conservação.

Legenda: Controlo T = 6°C —◆—; Controlo T = 15°C —■—; Aditivos T = 15°C —▲—; Aditivos x2 T = 15°C —×—.

Novamente, a evolução do pH acompanha a evolução da acidez, na relação que é característica entre estes parâmetros

A temperatura superior, o efeito da ativação do sistema parece ser mais nítido. O ensaio que decorreu a 30°C (figura 44) demonstrou que existe maior evolução dos parâmetros analisados, num mesmo período de tempo, sendo esta evolução essencialmente significativa para o controlo, sem diferenças consideráveis nas amostras com aditivos, embora a que tem o dobro dos mesmos revele uma acidez ligeiramente inferior e um valor de pH um pouco superior.

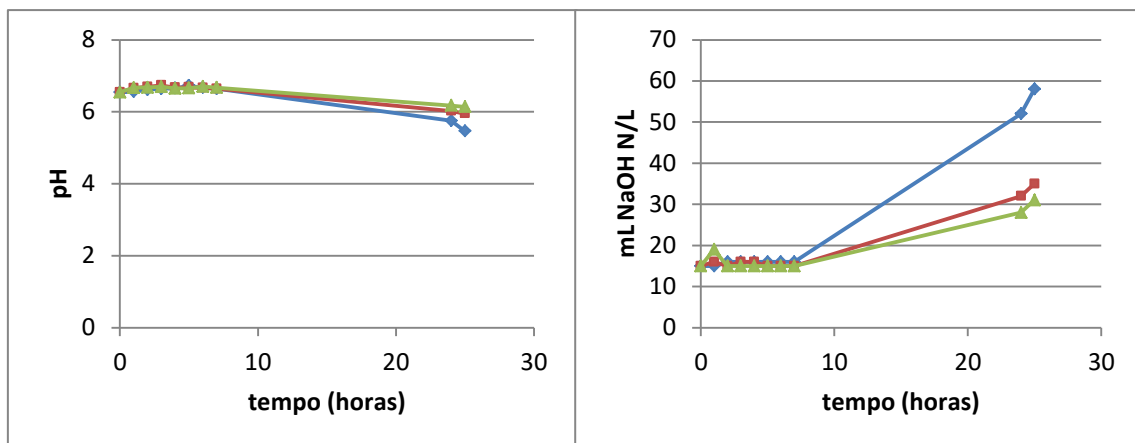


Figura 44 - Evolução do pH e da acidez titulável do leite de cabra ao longo do tempo (0-7, 24 e 25 horas), para cada método de conservação.

Legenda: Controlo T=30°C —♦—; Aditivos T = 30°C —■—; Aditivos x2 T = 30°C —▲—.

A Portaria nº 472/87 de 4 de Junho de 1987, apesar de atualmente revogada, refere indicadores que continuam com valor relevante para interpretação de diversos parâmetros de qualidade do leite. Neste documento o limite máximo de acidez indicado para leite alimentar a nível de centros de concentração e de tratamento ou das fábricas é de 20 mL NaOH N/L.

Os valores obtidos na análise das diferentes amostras de leite estão dentro do limite referido em praticamente todos os casos (controlo 6°C até à hora 26, controlo 15°C até à 6ª hora, aditivos e aditivos x2 a 15°C até à 24ª hora e todas as amostras a 30°C até à hora 7). O controlo a 15°C demonstra ainda estar conforme após 24 horas de ensaio para leites destinados à utilização industrial, para transformação.

Parece, assim, que, neste ensaio, o sistema se manteve eficiente na conservação do leite de cabra por um período de cerca de 10-12h, com maior evidência para uma temperatura de conservação mais elevada.

Deste modo, pode-se afirmar, que os resultados obtidos neste ensaio com leite de cabra estão conforme o esperado a partir do guia *Codex Alimentarius – Guidelines for the preservation of raw milk by use the lactoperoxidase system*, apesar do reduzido período de vida útil determinado para o leite refrigerado, em comparação com as conclusões de Pokrel e Ladas (2012) para leite de vaca. Os meus autores, tal como nos ensaios em discussão verificaram que o aumento da temperatura provoca a diminuição do tempo de vida útil dos produtos.

5.2.3.2 Soro de leite de cabra

A figura 45 apresenta os resultados associados à avaliação do pH e da acidez titulável de soro de leite ao longo de tempo, um período máximo de 24 horas, em função das diversas modalidades de ensaio com soro de leite de leite de cabra

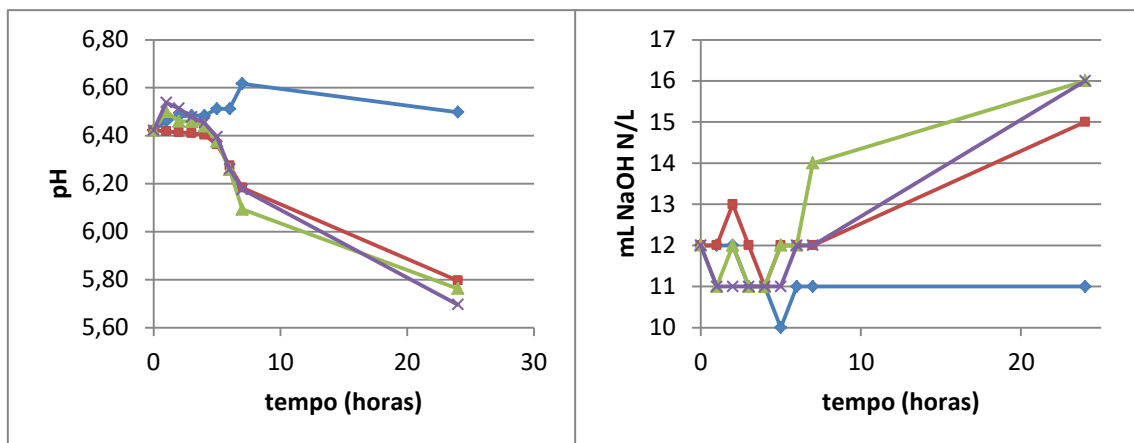


Figura 45 - Evolução do pH e da acidez titulável do soro de leite de cabra ao longo do tempo (0-7, 24 horas), para cada método de conservação.

Legenda: Controlo T = 6°C —♦—; Controlo T = 15°C —■—; Aditivos T = 15°C —▲—; Aditivos x2 T = 15°C —×—.

A observação da figura permite concluir que a acidez que se desenvolve ao longo do tempo não é muito díspare entre as diferentes modalidades de ensaio, notando-se após a 7ª hora grande evolução desta no caso de todas as amostras conservadas a 15°C, embora permanecendo muito aproximadas entre si. Note-se que o controlo a 15°C acaba por ter um percurso semelhante às amostras com aditivos, significando que estes parecem não ter efeito relativamente a uma melhor conservação. A amostra controlo a 6°C, permanece estável ao longo do ensaio e tal como se pode notar, graficamente, distante da acidez atingida pelas restantes amostras. Todas estas tendências parecem permanecer relativamente à evolução do pH

O ensaio em discussão desenvolveu-se até ao limite inferior do tempo de conservação de leite cru de bovino/búfalo (T 15 °C, 24 – 26 horas) referido pelo guia *Codex Alimentarius – Guidelines for the preservation of raw milk by use the lactoperoxidase system*, o que permite afirmar que tal como está estipulado no mesmo, embora para outro produto e outras espécies, o soro de leite apresenta as condições adequadas após 24 horas a, uma temperatura de 15°C, medindo-se no final uma acidez inferior à estipulada para leite pela portaria nº 472/87, cujo limite máximo de acidez para leite alimentar a nível de centros de concentração e de tratamento ou das fábricas é de 20 mL NaOH N/L.

5.2.4 Avaliação global dos resultados

A WHO/FAO (2005) assume que o sistema lactoperoxidase/tiocianato tal como é utilizado para bovino e búfalo, com o mesmo binómio tempo/temperatura, é possível ser utilizado para leite ovino e caprino. Tal como se pode verificar anteriormente, os resultados não indicam essa possibilidade, para uma temperatura ambiente que foi estipulada nos ensaios em 15°C. Para ambos os tipos de leite não se verificou vantagem da utilização da ativação do sistema em relação a controlo conservado à mesma temperatura, mesmo com o dobro dos aditivos face ao aconselhado pela FAO. Muito menos os resultados se aproximaram da eficiência que a refrigeração demonstrou.

Pelo menos duas possíveis condicionantes do trabalho se colocam e devem ser consideradas. Por um lado, os níveis de contaminação microbiana dos leites utilizados nos ensaios era muito elevado notando-se que apenas o leite de cabra era o único que obedecia ainda aos critérios microbiológicos indicados pelo Regulamento 853/2005 de 29 de Abril de 2004.

Como o referido pela WHO/FAO, o sistema deve ser ativado logo a seguir à ordenha, de forma a ser eficaz, evitando que seja utilizado já com a microbiota ativa e em desenvolvimento, o que não foi o caso das amostras utilizadas neste trabalho. Na verdade, Wolfson e Sumner (1993) e a WHO/FAO (2005) indicam que o sistema se mostra eficiente a contaminações microbianas reduzidas; o efeito bactericida regista-se para contaminações reduzidas (10^2 ufc/mL) e a um nível de microrganismos superior ($10^6 - 10^7$ ufc/mL) o efeito bacteriostático torna-se mais evidente.

Por outro lado, a utilização de amostras congeladas (-18°C) em vez de leite e soro de leite frescos pode ser uma condicionante importante. Por questões logísticas não foi possível trabalhar com leites recém-ordenhados, tendo existido a necessidade de utilizar a congelação para a conservação do leite até aos ensaios. Não tendo sido possível encontrar referências bibliográficas sobre este efeito na eficiência do sistema e não tendo havido possibilidade de testar o método em amostras frescas, coloca-se a hipótese de a congelação/descongelação afetar de alguma forma o desenvolvimento inicial normal dos microrganismos; eventualmente os microrganismos podem levar algum tempo a retomar a sua atividade metabólica, a qual poderá ocorrer quando a produção de metabolitos ativos sobre os microrganismos produzidos pelo sistema está já em declínio, não se produzindo o efeito esperado.

Uma terceira consideração relaciona-se com a escolha da temperatura ambiente de conservação. Quando se optou pela inclusão da temperatura de 30°C para testar o efeito de conservação, forçando a alteração das características do leite, designadamente no que se refere ao controlo sem refrigeração, a ativação do sistema deu indicações de ter sido eficiente para a conservação do leite de cabra. A temperatura de 30°C está mais próxima da temperatura de desenvolvimentos dos microrganismos mesófilos, os que mais facilmente desenvolvem acidez no leite, enquanto a 15°C , temperatura menos adequada à atuação dos microrganismos acidificantes, se privilegiam alguns destes microrganismos mas também os psicrotróficos, os quais atingiram níveis muito elevados nos leites utilizados, quase ao nível da contagem total de microrganismos a 30°C , o que reforça a necessidade de, em ensaios futuros, se utilizar leite recém-ordenhado.

Por questões relacionadas com o tempo disponível para a execução das teses de mestrado, não foi possível estender o plano experimental face à evolução dos resultados. No entanto, este aspeto, que pode estar ligado à sensibilidade dos grupos microbianos, deve ser considerado em trabalhos futuros.

6 Conclusões

Como foi referido ao longo do trabalho, este é desenvolvido em duas fases: otimização da ativação do sistema lactoperoxidase/tiocianato e comparação de procedimentos de conservação.

Relativamente à primeira parte abordou-se a composição físico-química, o pH e a concentração de tiocianato em leite e soro de leite. Os valores da análise da composição físico-química encontraram-se dentro do expectável para os diferentes tipos de leites e de soros de leites. Tal como o esperado, verificou-se maior variação na gordura e consequentemente nos sólidos totais. Relativamente ao pH, este aparentou estar dentro dos valores encontrados na bibliografia qualificando-se os soros de leites analisados como soro de leite doce, estando portanto conforme o esperado, face à origem do mesmo.

Quanto à concentração de tiocianato, a informação existente ainda é escassa e dispersa, principalmente para os produtos em estudo. Neste conjunto de análises laboratoriais foi igualmente possível verificar a importância da origem dos produtos; todos eles mostraram concentrações de tiocianato compatíveis com a aplicação do método de ativação do sistema lactoperoxidase/tiocianato pela FAO.

A comparação de procedimentos de conservação abordou a componente microbiana, o pH e a acidez titulável, isto é, foi abordada a evolução microbiana e duas medidas fundamentais da sua ação mais comum em leite e produtos lácteos. Uma abordagem conjunta a partir dos três parâmetros analisados concluiu que, para conservação quer de leite de cabra e de ovelha, quer de soro de leite, não existiram diferenças significativas entre as três modalidades consideradas à temperatura de 15°C, ao longo de um período de dois dias, existindo uma clara distinção entre estas e o controlo, a uma temperatura de 6°C, isto é, face à refrigeração. Estes resultados significam que a ativação do sistema não se revelou eficiente relativamente à conservação do leite a uma temperatura ambiente de 15°C. Para qualquer dos níveis de aditivos utilizados, nunca foi detetado peróxido de hidrogénio nos lotes de leite e soro de leite em ensaio.

A avaliação isolada da acidez titulável para monitorização mais pormenorizada da evolução das propriedades ao longo de cerca de 24 horas mostrou em leite de cabra, maior distinção entre a amostra controlo a 15°C e as com aditivos à mesma temperatura, verificando um menor período de vida útil para o controlo, resultado de um desenvolvimento de acidez superior, continuando a não se verificar diferenças significativas entre as duas amostras com aditivos, com concentrações distintas.

Este conjunto de resultados permitiu assim notar a eficiência, já conhecida, do método de refrigeração, e que, o sistema se manteve eficiente na conservação do leite de cabra por um período de cerca de 10-12h, com maior evidência para uma temperatura de conservação mais elevada (30°C). No soro de leite, o efeito não foi evidente, não tendo sido obtida grande diferença entre as amostras conservadas a 15°C (controlo e com ativação do sistema), apesar da evolução da acidez não ter sido muito acentuada ao fim de 24 horas.

Em modo de conclusão, não se assumem os resultados obtidos como conclusivos, pois de modo geral não se apresentaram conforme o esperado, colocando-se a necessidade de continuação dos ensaios ultrapassando algumas limitações dos ensaios que foram identificados, designadamente

os efeitos da elevada carga microbiana inicial e a hipótese de a congelação/descongelação dos lotes de leite e de soro de leite terem influenciado o processo.

Deste modo, assume-se ainda haver trabalho a realizar, sobretudo dada a falta de informação de aplicação deste sistema aos produtos em estudo. Sugere-se como trabalho futuro a avaliação do sistema trabalhando junto de explorações de produção de leite ou de queijarias, tornando possível a utilização de amostras frescas e não congeladas, bem como a avaliação mais consistente do efeito das temperaturas de ensaio, na sua relação com a atuação dos diferentes grupos microbianos.

7 Bibliografia

- Adamson, M., Carlsson, J. (1982). Lactoperoxidase and Thiocyanate Protect Bacteria from Hydrogen Peroxide. *Infection and Immunity*, 35 (1), 20–24.
- Alonso, L., Fontecha, J., Lozada, L., Fraga, M. J., Juárez, M. (1999). Fatty Acid Composition of Caprine Milk: Major, Branched-Chain, and Trans Fatty Acids. *Journal of Dairy Science*, 82(5), 878–884.
- Althaus, R. L., Molina, M. P., Rodriguez, M., Fernandez, N. (2001). Analysis time and lactation stage influence on lactoperoxidase system components in dairy ewe milk. *Journal of Dairy Science*, 84(8), 1829–1835.
- Al-Wabel, N. A. (2008). Mineral contents of milk of cattle, camels, goats and sheep in the central region of Saudi Arabia. *Asian Journal of Biochemistry*, 3(6), 373–375.
- Amaral, T. (2013). Intolerância à lactose. Acedido em: 19, Junho, 2018. In: <http://bioquimicadanut.blogspot.com/2013/07/intolerancia-lactose.html>
- Amiot, J. (1991). *Ciencia y tecnologia de la leche*. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza
- Anifantakis, E.M., (1986). Comparison of the physico-chemical properties of ewe's and cow's milk. In: *International Dairy Federation (Ed.), Proceedings of the IDF Seminar Production and Utilization of Ewe's and Goat's Milk, Bulletin No. 202*, pp. 42–53. Athens, Greece.
- Arcuri, E. F., Brito, M. A. V. P., Brito, J. R. F., Pinto, S. M., Ângelo, F. F., Souza, G. N. (2006). Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 58(3), 440–446.
- Arnhold, J., Monzani, E., Furtmüller, P. G., Zederbauer, M., Casella, L., Obinger, C. (2006). Kinetics and Thermodynamics of Halide and Nitrite Oxidation by Mammalian Heme Peroxidases. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2006(19), 3801–3811.
- Aune, Thomas, E. L. (1978). Oxidation of Protein Sulfhydryls by Products of Peroxidase-Catalyzed Oxidation of Thiocynate Ion. *Oxidation of protein sulphydryls*, 17(6), 1005–1010.
- Barabás, J. *An alternative method of milk treatment*. Acedido em: 29, Agosto, 2018. In: <http://www.fao.org/docrep/v6200t/v6200T0t.htm#TopOfPage>.
- Bafort, F., Parisi, O., Perraudin, J.-P., Jijakli, M. H. (2014). Mode of Action of Lactoperoxidase as Related to Its Antimicrobial Activity: A Review. *Enzyme Research*, 2014, 1–13.
- Bardsley WC (1985) Steady-state kinetics of lactoperoxidasecatalysed reactions. In Pruitt, K. M., Tenovuo, J.O. (eds). *The Lactoperoxidase System, Chemistry and Biological Significance*, Marcel Dekker. New York. In: Kussendrager and Van Hooijdonk, 2000.
- Barrett, N. E., Grandison, A. S., Lewis, M. J. (1999). Contribution of the lactoperoxidase system to the keeping quality of pasteurized milk. *Journal of Dairy Research*, 66(1), 73–80.
- Battistuzzi, G., Bellei, M., Bortolotti, C. A., Sola, M. (2010). Redox properties of heme peroxidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 500(1), 21–36.
- Belding, M.E., Klebanoff, S.J., and Ray, G.C. (1970). Peroxidase-mediated virucidal systems. *Science*, 167, 195-196. In: Naidu, 2000.

- Björck, L., Claesson, O. (1980). Correlation between concentration of hypothiocyanate and antibacterial effect of the lactoperoxidase system against *Escherichia coli*. *Journal of Dairy Science*, 63(6), 919–922.
- Björck, L., Rosen, C. G., Marshall, V., Reiter, B. (1975). Antibacterial activity of the lactoperoxidase system in milk against pseudomonads and other gram-negative bacteria. *Applied Microbiology*, 30(2), 199–204.
- Booth, K. S., Kimura, S., Lee, H. C., Ikeda-Saito, M., Caughey, W. S. (1989). Bovine myeloperoxidase and lactoperoxidase each contain a high affinity site for calcium. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 160(2), 897–902.
- Boscolo, B., Leal, S. S., Salgueiro, C. A., Ghibaudi, E. M., Gomes, C. M. (2009). The prominent conformational plasticity of lactoperoxidase: A chemical and pH stability analysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1794(7), 1041–1048.
- Brozos, C., Saratsis, P., Boscós, C., Kyriakis, S. C., Tsakalof, P. (1998). Effects of long-term recombinant bovine somatotropin (bST) administration on milk yield, milk composition and mammary gland health of dairy ewes. *Small Ruminant Research*, 29, 113–120.
- Buys, E. M. (2011). Lactoperoxidase. *Elsevier Ltd*, 319–323.
- Bylund, Gösta (2003). *Dairy Processing Handbook*. Lund : Tetra Pak Processing Systems. In: Portelinha, 2013.
- Carvalho, F., Prazeres, A. R., Rivas, J. (2013). Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. *Science of The Total Environment*, 445–446, 385–396.
- Ceballos, L. S., Morales, E. R., de la Torre Adarve, G., Castro, J. D., Martínez, L. P., Sampelayo, M. R. S. (2009). Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(4), 322–329.
- Chamberlain, A. (1989). *Milk production in the tropics*. London: Longman Scientific and Technical UK Limited. In: Seifu et al., 2005.
- Chance, B. (1952). The kinetics and stoichiometry of the transition from the primary to the secondary peroxidase peroxide complexes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 41(2), 416–424.
- Chandan, R.C., Attaie, R., Shahani, K.M., 1992. Nutritional aspects of goat milk and its products. In: *Proc. V. Intl. Conf. Goats, vol. II: part II*, New Delhi, India, p. 399. In: Park, 2007.
- Chandan, R. C. (1997). *Dairy - Based Ingredients*. Eagan Press. Universidade of Wisconsin - Madison.
- Claeys, W. L., Ludikhuyze, L. R., Van Loey, A. M., Hendrickx, M. E. (2001). Inactivation kinetics of alkaline phosphatase and lactoperoxidase, and denaturation kinetics of B-lactoglobulin in raw milk under isothermal and dynamic temperature conditions.pdf. *Journal of Dairy Research*, (68), 95–107.
- Codex Alimentarius (2011). Guidelines for the preservation of raw milk by use of the lactoperoxidase system (CAC/GL - 1991). In: *Milk and milk products*, 2nd edition. pp. 233-239 World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Dahlberg, P. A., Bergmark, A., Björck, L., Bruce, Å, Hambraeus, L., Claesson, O. (1984). Intake of thiocyanate by way of milk and its possible effect on thyroid function. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 39(3), 416–420.

Davies, M. J., Hawkins, C. L., Pattison, D. I., Rees, M. D. (2008). Mammalian Heme Peroxidases: From Molecular Mechanisms to Health Implications. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(7), 1199–1234.

Deodha T, A.D. and Mehta, A.K. (1980) *NDR1. Ann. Rept.* p.189. In: Gupta *et al.*, 1986.

Doores, S., Pruiwtt, K. M. (Sept., 1990). Enhanced Thermal Destruction of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by the Lactoperoxidase System. *Applied and Environmental Microbiology*, 56 (9), 2711-2716.

Doyle, M. P., Marth, E. H. (1978). Degradation of aflatoxin by lactoperoxidase. *Zeitschrift Lebensmittel-Untersuchung Und -Forschung*, 166(5), 271–273.

Dumitraşcu, L., Stănciuc, N., Stanciu, S., Râpeanu, G. (2012). Thermal inactivation of lactoperoxidase in goat, sheep and bovine milk – A comparative kinetic and thermodynamic study. *Journal of Food Engineering*, 113(1), 47–52.

Ekstrand B (1994) Lactoperoxidase and lactoferrin. In: Dillon, V. M., Board, R. G, (eds). *Natural Antimicrobial Systems and Food Preservation*, Wallingford: CAB International.

Ermans, A. M., F. Delange, M. van der Velden, and J. Kinthaert. (1972). Possible role of cyanide and thiocyanate in the etiology of endemic cretinism, pp. 455-486. In J. B. Stanbury and R. L. Kroc (eds.) *Human development and the thyroid gland. Advances in Experimental Medicine and Biology Series*, vol. 30. Plenum Press, New York. In: Reiter and Härnulf, 1984.

Everse, J., Grisham, M. B., Everse, K. E. (1990). *Peroxidases in Chemistry and Biology*, volume 1 CRC Press.

FAO/WHO. (1990) Evaluation of certain food additives and contaminants. 35^o *Relatório da Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*. WHO Technical Report Series, No. 789. WHO, Geneva.

Fagnani, R., (2016). Microfiltração em produtos lácteos: princípios e aplicações. Acedido em: 13, Setembro, 2018. In: <https://www.milkpoint.com.br/colunas/rafael-fagnani/microfiltracao-em-produtos-lacteos-principios-e-aplicacoes-99178n.aspx>.

Fernández, O., Marrero, E., Capdevila, J. Z. (2005). Safety Considerations on lactoperoxidase system use for milk preservation. *Revista de Salud Animal*, 27(3), 186-189.

Fonseca, L. F. L. (1998) Qualidade do leite e sua relação com equipamento de ordenha e sistema de resfriamento. In: *Simpósio internacional sobre qualidade do leite*, 1., p. 54-56, Curitiba.

Fonteh, F. A., Grandison, A. S., Lewis, M. J. (2002). Variations of lactoperoxidase activity and thiocyanate content in cows' and goats' milk throughout lactation. *Journal of Dairy Research*, 69(3), 401–409.

Fonteh, F. A., Grandison, A. S., Lewis, M. J. (2005). Factors affecting lactoperoxidase activity. *International Journal of Dairy Technology*, 58(4), 233–236.

Fox, P. F., McSweeney, P. L. H. (1998). *Dairy chemistry and biochemistry* 1st ed. Blackie Academic & Professional. London.

Fox, P. F.; Guinee, T.; Cogan, T.; McSweeney, P. (2000). *Fundamentals of Cheese Science*. Gaithersburg : Aspen Publishers.

Furtmüller, P. G., Zederbauer, M., Jantschko, W., Helm, J., Bogner, M., Jakopitsch, C., Obinger, C. (2006). Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 445(2), 199–213.

Furtmüller, P. G., Jantschko, W., Regelsberger, G., Jakopitsch, C., Arnhold, J., Obinger, C. (2002). Reaction of Lactoperoxidase Compound I with Halides and Thiocyanate. *Biochemistry*, 41, 11895-11900.

Ghibaudi, E., Laurenti, E. (2003). Unraveling the catalytic mechanism of lactoperoxidase and myeloperoxidase. A reflection on some controversial features. *European Journal of Biochemistry*, 270(22), 4403–4412.

Grandison, A. (1986). Causes of variation in milk composition and their effects on coagulation and cheese making. *Dairy Ind. Int.*, 51: 21-24.

Guo, M. (2003). Goat's milk. In: Caballero, B., Trugo, L., Finglas, P. (Eds.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Academic Press, London, UK, pp. 2944–2949. In: Park *et al.*, 2007.

Gupta, V. K., Patel, R. S., Patil, G. R., Singh, S., Mathur, B. N. (1986). Preservation of milk with hydrogen peroxide and lactoperoxide/thiocyanate/hydrogen peroxide systems. *Indian Journal Dairy Science*, 39(3), 269-276.

Haddadin, M. S., Ibrahim, S. A., Robinson, R. K. (1996). Preservation of raw milk by activation of the natural lactoperoxidase systems. *Food Control*, 7(3), 149–152.

Haenlein, G.F.W., Caccese, R. (1984). Goat milk versus cow milk. In: *Haenlein, G.F.W., Ace, D.L. (Eds.), Extension Goat Handbook*. USDA Publ., Washington, DC, p. 1, E-1. In: Park *et al.*, 2007.

Haenlein, G.F.W. (2001). The nutritional value of sheep milk. *Int. J. Animal Sci.* 16, 253–268. In: *Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk*. In: Rodriguez, 2001.

Hanstrom, L., A. Johansson, and J. Carlsson. (1983). Lactoperoxidase and thiocyanate protect cultured mammalian cells against hydrogen peroxide toxicity. *Med. Biol.* 61:268-274. In: Reiter and Härnult, 1984.

Haque, E; Chand, R., (2008). *Eur Food Res Tech*, 227(1): 7-15.

Härnult, G., & Kandasamy, C. (1982). Increasing the keeping quality of milk by activation of its lactoperoxidase system: Results from Sri Lanka. *Milchwissenschaft*, 37, 454–457. In: Seifu *et al*, 2005.

Hawkins, C. L. (2009). The role of hypothiocyanous acid (HOSCN) in biological systems. *Free Radical Research*, 43(12), 1147–1158.

Herández CMM, van Markwijk, BW & Vreeman, HJ (1990) Isolation and properties of lactoperoxidase from bovine milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 44, 213-231. In: Kussendrager and Van Hooijdonk, 2000.

Hillerton, J. E., Morgan, W. F., Farnsworth, R., Neijenhuis, F., Baines, J. R., Mein, G. A., ... Timms, L. (2001). Evaluation of bovine teat condition. In: *Commercial dairy herds: Infectious factors and infections. Proceedings of the 2nd International Symposium on Mastitis and Milk Quality*, 352-356. Institute for Animal Health. Compton, United King.

Hogg, D. M., Jago, G. R. (1970). The Antibacterial Action of Lactoperoxidase, *Biochemistry Journal*, 117, 779-790.

Hoogendoorn, H., Piessens, J. P., Scholtes, W., Stoddard, A. (1977). Hypothiocyanite Ion; the Inhibitor Formed by the System Lactoperoxidase-Thiocyanate-Hydrogen Peroxide. *Caries Res*, 11, 77-84.

Huppertz, T. (2010). High pressure processing of milk. In *Improving the Safety and Quality of Milk* (pp. 373–399). Elsevier.

Ihalin, R., Loimaranta, V., Tenovuori, J. (2006). Origin, structure, and biological activities of peroxidases in human saliva. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 445(2), 261–268.

INE - Statistics Portugal. (2016). *Estatísticas Agrícolas 2016*. Instituto Nacional de Estatística. Lisboa

ISO 4833-1 (2013). *Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate technique*. ISO, Geneva.

ISO 21528-2 (2004). *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae – Part 2: Colony-count method*. ISO, Geneva.

ISO 6730|IDF 101 (2005). Milk – Enumeration of colony forming units of psychrotrophic microorganisms – Colony – count technique at 6,5 °C. ISO, Geneva; IDF, Brussels

Jandal, J. M. (1996). Comparative aspects of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 22(2), 177–185.

Jelen, P. (1992). Whey cheeses and beverages. In J. G. Zadow (Ed.), *Whey and lactose processing* (pp. 157–193). New York, NY, USA: Elsevier. In: Smithers, 2008.

Jenness, R. (1979). Comparative aspects of milk proteins. *Journal of Dairy Research*, 46, 197–210.

Jha, Y.K. (1984) *Accelerated ripening of Cheddar Cheese from buffalo milk*, Ph.D. Thesis, Kurukshetra University, Kurukshetra. In: (Gupta et al., 1986).

Kamau, D. N., Doores, S., & Pruitt, K. M. (1991). Activation of the lactoperoxidase system prior to pasteurisation for shelf-life extension of milk. *Milchwissenschaft*, 46, 213–214.

Kaster, B. (2009). *Efeitos das condições operacionais na microfiltração do suco de maçã*. Tese de Mestrado em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina Centro Tecnológico, Florianópolis. 83 pp.

Klebanoff, S., Clem, W., Luebke, R. (1966). The peroxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide antimicrobial system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 117(1), 63–72.

Kohler, H., Jenzer, H. (1989). Interaction of lactoperoxidase with hydrogen peroxide Formation of enzyme intermediates and generation of free radicals. *Free Radical Biology and Medicine*, 6(3), 323–339.

Kohler, H., Taurog, A., Dunford, H. B. (1, August, 1988). Spectral Studies with Lactoperoxidase and Thyroid Peroxidase: Interconversions between Native Enzyme, Compound II, and Compound III. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 264 (2)438-449.

Koopmans, M., Duizer, E. (2004). Foodborne viruses: an emerging problem. *International Journal of Food Microbiology*, 90(1), 23–41.

Korhonen, H. (1980). A new method for preserving raw milk—The lactoperoxidase antibacterial system. *World Animal Review*, 35, 23–29. In: Seifu et al., 2005.

Kosikowski, F. (1977) *Cheese mld fermented milk f(Jods*. Cornell University, Ithaca, New York. In: Gupta et al., 1986.

Kussendrager, K. D., Van Hooijdonk, A. C. M. (2000). Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. *British Journal of Nutrition*, 84(S1), 19–25.

Lara, R., Mendoza, A., de la Cruz, I., & Garcia, H. S. (1987). Effect of the lactoperoxidase system on yield and characteristics of fresh type cheese. *Milchwissenschaft*, 42, 773–775.

Lins, L. (2013). *Ativação do sistema lactoperoxidase na conservação do leite cru para fabricação de queijo de coalho*. Tese de Mestrado em Zootecnia. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 95 pp.

Lijinsky, W., Kovatch, R. M. (1989). Chronic Toxicity Tests of Sodium Thiocyanate With Sodium Nitrite in F344 Rats. *Toxicology and Industrial Health*, 5(1), 25–29.

Lorenzen, P. C., Martin, D., Clawin-Rädecker, I., Barth, K., Knappstein, K. (2010). Activities of alkaline phosphatase, γ -glutamyltransferase and lactoperoxidase in cow, sheep and goat's milk in relation to heat treatment. *Small Ruminant Research*, 89(1), 18–23.

Luck, H. (1962). The use of hydrogen peroxide in milk and dairy products, pp. 423-447. In Milk hygiene. World Health Organization, Monograph Series. No. 48, Geneva, Switzerland.

Marks, N. E., Grandison, A. S., Lewis, M. J. (2001). Use of hydrogen peroxide detection strips to determine the extent of pasteurization in whole milk. *International Journal of Dairy Technology*, 54(1), 20–22.

Mavropoulou, I. P., Kosikowski, F. V. (1973). Composition, Solubility, and Stability of Whey Powders. *Journal of Dairy Science*, 56(9), 1128–1134.

Medina, M., Gaya, P., Nuñez, M. (1989). The lactoperoxidase system in ewes' milk: levels of lactoperoxidase and thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology*, 8(4), 147–149.

Menezes, M. F., Simeoni, C. P., Bortoluzzi, D., Huerta, K., Etchepare, M., Menezes, C. (Mai, 2014). Microbiota e conservação do leite. *Revista do Centro do Ciências Naturais e Exatas/ Revista Eletrônica Em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*, 18, 76-89.

Mens, P.L. 1985. Propriétés physico-chimiques nutritionnelles et chimiques (physico chemical nutritional and chemical properties). In: Luquet, F.M. (Ed.), *Laits et Produits Laitiers. Vache. Brevis. Chèvre (Milk and Milk Products from Cows, Sheep and Goats)*, vol. pp. 349–367I. Apria, Paris,. In: Park et al., 2007.

Metwally, M. M. K., & Nasr, M. M. (1992). Preservation of raw milk by activation of the lactoperoxidase system: Review article. *Egyptian Journal of Food Science*, 20, 175–196.

Modi, S., Deodhar, S. S., Behere, D. V., Mitra, S. (1991). Lactoperoxidase-calyzed Oxidation of Thiocyanate by Hydrogen Peroxide: 15N Nuclear Magnetic Resonance and Optical Spectral Studies. *Biochemistry*, 30, 118-124.

Morr, C.V. (1989) *Whey proteins: manufacture*. Development in Dairy Chemistry-4, Fox, P.F. (Ed.), p245, Elsevier Applied Science, New York.

Moulin, G., Galzy, P. (1984). Whey, a Potential Substrate for Biotechnology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 1(1), 347–374.

Naidu, A. S. (2000). Lactoperoxidase. In *Natural Food Antimicrobial Systems* (p. 30). CRC Press. Boca Raton, Fl.

Nakada, M., Dosako, S., Hirano, R., Oooka, M., Nakajima, I. (1996). Lactoperoxidase suppresses acid production in yoghurt during storage under refrigeration. *International Dairy Journal*, 6(1), 33–42.

Namba, K. (1990). Compositional standards and standards of manufacturing and storing methods of milk products, In *Ministerial Ordinance Concerning Compositional Standurds, Etc. ,fbr milk and milk products*, eds. Japan Food Hygiene Association, Tokyo, pp. 3341. In: Nakada *et al.*, 1996.

Nobrega, R., Borges, C.P., Habert, A.C. (2005) Processos de separação por membranas. In: Junior, A.P., Kilikian, B.V. (eds) *Purificação de produtos biotecnológicos*. Editora Manole Ltda, São Paulo. In: Kaster, 2009.

NP – 470 (1983). LEITES – Determinação da acidez. Direção Geral da Qualidade (DGQ), Lisboa.

Ordoñez, J. A. (2005) Tecnologia de alimentos.(volumes 1 e 2) São Paulo: Ed. Artmed.

Oram, J. D., Reiter, B. (1966). The inhibition of streptococci by lactoperoxidase, thiocyanate and hydrogen peroxide. The effect of the inhibitory system on susceptible and resistant strains of group N streptococci. *Biochemical Journal*, 100(2), 373.

Özer, B. (2014). Natural Anti-microbial Systems | Lactoperoxidase and Lactoferrin. In *Encyclopedia of Food Microbiology* (pp. 930–935). Elsevier.

Özer, B., Yaman, H. (2014). Milk and Milk Products | Microbiology of Liquid Milk. In *Encyclopedia of Food Microbiology* (pp. 721–727). Elsevier.

Pakkanen, R., Aalto, J. (1997). Growth factors and antimicrobial factors of bovine colostrum. *International Dairy Journal*, 7(5), 285–297.

Palmquist, D. L., Denise Beaulieu, A., Barbano, D. M. (1993). Feed and Animal Factors Influencing Milk Fat Composition. *Journal of Dairy Science*, 76(6), 1753–1771.

Park,Y.W. (2006). Goat milk—chemistry and nutrition. In: Park,Y.W., Haenlein, G.F.W. (Eds.), *Handbook of Milk of Non-bovine Mammals*. Blackwell Publishing Professional pp. 34–58., Oxford, UK/Ames, Iowa.

Park, Y. W., Juárez, M., Ramos, M., Haenlein, G. F. W. (2007). Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68(1–2), 88–113.

Paul KG & Ohlsson PI (1985) The chemical structure of lactoperoxidase. In Pruitt, K. M., Tenovuo, J.O. (eds). *The Lactoperoxidase System, Chemistry and Biological Significance*, Marcel Dekker. New York:.

Pearce, R.J. (1986) *Fractionation of whey proteins*. Bulletin of the International Dairy Federation 212: 150.

Pokhrel, P., Das, S. K. L. (2014). Study on the Extension of Shelf-life by Activation of Inherent Lactoperoxidase System in Raw Cow Milk. *Journal of Food Science and Technology Nepal*, 7, 57-60.

Pollock, J. R., Goff, H. M. (1992). Lactoperoxidase-catalyzed oxidation of thiocyanate ion: a carbon-13 nuclear magnetic resonance study of the oxidation products. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1159(3), 279–285.

Ponce, C.P. (2005). Reports of field studies from Cuba and other South-American and central-American countries presented at the technical meeting on the benefits and potential risks of the LP-system of raw milk preservation. Rome, 28 Nov. 2005 – 2 Dec. 2005. In: WHO and FAO, 2005.

Portaria nº 472/87 de 4 de Junho de 1987. *Diário da República nº 128 - I Série*. Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação e da Indústria e Comércio. Lisboa.

Portelinha, D. M. G. (Outubro, 2013). *Valorização do soro para produção de iogurte*. Tese em Tecnologia Química e Alimentar. Universidade do Minho. Minho. 86 pp.

Posati, L.P., Orr, M.L. (1976). Composition of Foods. In: Agriculture Handbook, 8-1. ARS, USDA, Washington, DC. In: Park *et al.*, 2007.

Pruitt, K. M., Tenovou, J. (1982). Kinetics of hypothiocyanite production during peroxidase-catalyzed oxidation of thiocyanate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 704(2), 204–214.

Pruitt, K. M., Tenovuo, J., Andrews, R. W., McKane, T. (1982). Lactoperoxidase-Catalyzed Oxidation of Thiocyanate: Polarographic Study of the Oxidation Products. *Biochemistry*, 21, 562-567.

K. M. Pruitt and J. O. Tenovuo, (1985) Eds., *The Lactoperoxidase System: Chemistry and Biological Significance*, vol. 27 of *Immunology Series*, Marcel Dekker, New York, NY, USA. In: Bafort *et al.*, 2014.

Pruitt, K. M., & Kamau, D. N. (1991). The lactoperoxidase system of bovine and human milk. In D. S. Robinson, & N. A. M. Eskin (Eds.), *Oxidative enzymes in foods*. London: Elsevier Applied Science (pp. 133–174). In: Seifu *et al.*, 2005.

Ramos, M., Juarez, M. (2003). Sheep milk. *Enciclopedia of Dairy Sciences*, 4, 494-502.

Raynal-Ljutovac, K., Lagriffoul, G., Paccard, P., Guillet, I., Chilliard, Y. (2008). Composition of goat and sheep milk products: An update. *Small Ruminant Research*, 79(1), 57–72.

Recio, I., Pérez-Rodríguez, M. L., Amigo, L., Ramos, M. (1997). Study of the polymorphism of caprine milk caseins by capillary electrophoresis. *Journal of Dairy Research*, 64(4), 515–523.

Regulamento (CE) Nº 853/2004 de 29 de Abril de 2004. *Jornal Oficial da União Europeia nº 139/55 - I Série*. Parlamento Europeu e do Conselho

Reiter, B., Härnolv, G. (1984). Lactoperoxidase antibacterial system: natural occurrence, biological functions and practical applications. *Journal of Food Protection*, 47(9), 724–732.

Reiter, B. (1984): The biological significance of the nonimmunoglobulin proteins in milk. Lysozyme, lactoferrin, lactoperoxidase. Cited in *Developments in Dairy Chemistry-3. Lactose and Minor Constituents*. ED. Fox, P. F. Elsevier Applied Science Publishers, p 281. In: Fernández *et al.*, 2005.

Reiter, B. (1985). Lactoperoxidase system of bovine milk. In K. M. Pruitt, & J. O. Tenovuo (Eds.), *The lactoperoxidase system: Chemistry and biological significance* (pp. 123–141). New York: Marcel Dekker. In: Seifu *et al.*, 2005.

Reiter B & Perraudin JP (1991) Lactoperoxidase: biological functions. In: Everse, J., Grisham M. B. (eds) *Peroxydases in Chemistry and Biology*. CRC Press. Boca Raton. In: Kussendrager and Van Hooijdonk, 2000.

Rodriguez, L. R. M. (2001). *Valorização da fração proteica do soro de queijo*. Tese de Mestrado em Biotecnologia - Engenharia de Bioprocessos. Escola de Engenharia - Universidade do Minho, Minho. 197 pp.

Roguiski, H., Fuquay, J., Fox, P. (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Academic Press, Amsterdam, pp. 1270–1279. In: Park *et al.*, 2007.

Royal Society of Chemistry. *High-speed centrifugation*. Acedido em: 30 de Agosto, 2018. In: <http://www.rsc.org/publishing/journals/prospect/ontology.asp?id=CMO:0002013&MSID=b9nr00256a>.

Sandholm, M., Ali-Vehmas, T., Kaartinen, L., Junnila, M. (1988). Glucose Oxidase (GOD) as a Source of Hydrogen Peroxide for the Lactoperoxidase (LPO) System in Milk: Antibacterial Effect of the GOD-LPO System against Mastitis Pathogens. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 35(1–10), 346–352.

SARKAR, S.; MISRA, A. K. (1994). Implication of LP system on manufacture of fermented milk products. *Indian Journal of Dairy Science*, 47, 133-139. In: Lins, 2003.

Seifu, E., Buys, E. M., Donkin, E. F. (2003). Effect of the lactoperoxidase system on the activity of mesophilic cheese starter cultures in goat milk. *International Dairy Journal*, 13(12), 953–959.

Seifu, E., Buys, E. M., Donkin, E. F. (2004). Quality aspects of Gouda cheese made from goat milk preserved by the lactoperoxidase system. *International Dairy Journal*, 14(7), 581–589.

Seifu, E., Buys, E. M., Donkin, E. F. (2005). Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential applications: a review. *Trends in Food Science & Technology*.

Sermon, J., Vanoirbeek, K., De Spiegeleer, P., Van Houdt, R., Aertsen, A., Michiels, C. W. (2005). Unique stress response to the lactoperoxidase-thiocyanate enzyme system in *Escherichia coli*. *Research in Microbiology*, 156(2), 225–232.

Schoos, S. S., Oliver, G., Fernandez, F. M. (1999). Relationships between lactoperoxidase system components in Creole goat milk. *Small Ruminant Research*, 32(1), 69–75.

Smithers, G. W. (2008). Whey and whey proteins—From ‘gutter-to-gold.’ *International Dairy Journal*, 18(7), 695–704.

Spanamberg, A., Hartfelder, C., Fuentesfria, A. M., Valente, P. (2004). Diversity and enzyme production by yeasts isolated from raw milk in Southern Brazil. *Acta Scientiae Veterinariae*, 32(3), 195,199.

Tahboub, Y. R., Galijasevic, S., Diamond, M. P., Abu-Soud, H. M. (2005). Thiocyanate Modulates the Catalytic Activity of Mammalian Peroxidases. *Journal of Biological Chemistry*, 280(28), 26129–26136.

Tebaldi, V. M. R., Oliveira, T. L. C. de, Boari, C. A., Piccoli, R. H. (2008). Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28(3), 753–760.

Tentoni, R., Pastore, M. & Ottogalli, G. (1968). Hydrogen peroxide for milk collection under difficult conditions. *Annali di microbiologia ed enzimologia*, p. 85-123. In: <http://www.fao.org/docrep/v6200t/v6200T0t.htm#TopOfPage>.

Thanabal V & La Mar GN (1989) A nuclear Overhauser effect investigation of the molecular and electronic structure of the heme crevice in lactoperoxidase. *Biochemistry* 28, 7038-7044.

Thomas, E. L., Aune, T. M. (1978). Lactoperoxidase, Peroxide, Thiocyanate Antimicrobial System: Correlation of Sulphydryl Oxidation with Antimicrobial Action. *Infection and Immunity*, 20(2), 456–463.

Tronco, V. M. (2010). *Manual para Inspeção de Qualidade do Leite*. 203 p. Santa Maria: Ed. UFSM.

Trujillo, A. J., Pozo, P. I., Guamis, B. (2007). Effect of heat treatment on lactoperoxidase activity in caprine milk. *Small Ruminant Research*, 67(2–3), 243–246.

Wit, J. N., & van Hooydonk, A. C. M. (1996). Structure, functions and applications of lactoperoxidase in natural antimicrobial systems. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 50, 227–244. In: Seifu *et al.*, 2005.

Whitaker, J. R. (2003). *Handbook of food enzymology*. Marcel Dekker, Inc. New York.

WHO, FAO. (2005). *Benefits and potential risks of the lactoperoxidase system of raw milk preservation*. Rome, 28 November - 2 December 2005; Food and Agriculture Organization of the United Nation/World Health Organization, 2006.

Wolfson, L. M., Sumner, S. S. (1993). Antibacterial Activity of the Lactoperoxidase System: A Review. *Journal of Food Protection*, 56(10), 887–892.

Yamazaki, I., Mason, H. S., Piette, L. (1959). Identification, by Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy, of Free Radicals Generated from Substrates by Peroxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 253 (8), 2444-2449.

Zadow, J. G. (2012). *Whey and Lactose Processing*. Springer Science & Business Media.

Zapico, P., Gaya, P., Nuñez, M., Medina, M. (1990). Lactoperoxidase and thiocyanate contents of goats' milk during lactation. *Letters in Applied Microbiology*, 11(2), 90–92.

Zapico, P., Gaya, P., Paz, M., Nuñez, M., Medina, M. (1991). Influence of Breed Animal, and Days of Lactation on Lactoperoxidase System Components in Goat Milk. *Journal of Dairy science*, 74(3), 783–787.

Zeni, M. P. (Jan/Jun, 2013). Influência dos microrganismos psicrotróficos sobre a qualidade do leite refrigerado para produção de uht. *Unoesc & Ciência - ACET*, 4(1), 61-70.